

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Entwicklung chimärer Zytokinrezeptoren zur funktionellen Analyse
der IL-23 Signaltransduktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christin Sophie Ruhland

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Doreen M. Floss

Zweitgutachter: Prof. Dr. Marc Jacobsen

Drittgutachter: Prof. Dr. Matthias J. Feige

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Baumgärtner, L.A.F., Ettich, J., Balles, H., Lapp, D.J., Mossner, S., Bassenge, C., Ouzin, M., Hanenberg, H., Scheller, J., Floss, D.M., (2024), Unpaired cysteine insertions favor transmembrane dimerization and induce ligand-independent constitutive cytokine receptor signaling. *Biological Chemistry*, 405(7-8)

Kashtanjeva, L., Ruhland, C., Horstmeier, F.C., Thives-Kurenbach, F., Ettich, J., Padrini, G., Streuber, S., Scheller, J., Dittrich, A., Floss, D.M., (2026), Receptor engineering constitutes feedback control and robustness of IL-23R signaling and highlights importance of intracellular cytokine receptor signaling motifs. *Cell Communication and Signaling*, 24(51)

Zusammenfassung

Interleukin 23 (IL-23) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin der IL-12 Familie, das an der Abwehr bakterieller Erreger und Pilzinfektionen beteiligt ist. Überaktivität von IL-23 kann jedoch gleichzeitig zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, Multipler Sklerose, chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen oder rheumatoider Arthritis beitragen. IL-23 vermittelt seine Signale über einen heterodimeren Rezeptor aus IL-12R β 1 und IL-23R. Nach Bindung an den Rezeptor wird u. a. der JAK-/STAT- (Januskinase/ *signal transducer and activator of transcription*) Signalweg aktiviert. Die aktivierten JAKs phosphorylieren Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne des IL-23R, die wiederum als Bindestelle für Signalproteine wie STAT3 oder SHP2 dienen. STATs induzieren u. a. die Transkription von *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) Proteinen. Einige Studien belegen, dass SOCS das ursprüngliche Zytokinsignal durch Interaktion mit dem Rezeptor in einem negativen Rückkopplungsmechanismus hemmt. Trotz Anstiegs der SOCS3 Expression in Zellen nach IL-23 vermittelter Signaltransduktion führt dies nicht zu einer negativen Regulation der JAK/STAT Kaskade wie beispielsweise im IL-6 und gp130 vermittelten Signalweg. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine SOCS3 vermittelte Reduktion des IL-23 Signals etabliert werden. Dafür wurden chimäre humane (h)IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten kloniert, die nach Transduktion und stabiler Expression in Ba/F3-Zellen hinsichtlich ihres Proliferations- und Stimulationsverhaltens nach IL-23 Gabe untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen nahe, dass eine SOCS3 vermittelte Hemmung des IL-23 Signals durch chimäre IL-23R möglich ist. Zudem konnte eine unterschiedliche IL-23 induzierte Proliferation von Ba/F3 Zelllinien mit chimären Rezeptoren beobachtet werden. Dies ist am ehesten auf Veränderungen des Motivs „WLYEDIPN“ um Tyrosin 397 des IL-23R zurückzuführen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die These, dass Y397 des humanen IL-23R eine Aktivierung des MAPK-Weges und somit eine STAT3 unabhängige Zellproliferation vermittelt. Neben der Untersuchung der SOCS3-Auswirkung auf die IL-23 induzierte STAT3 Aktivität sollte eine ligandenunabhängige, konstitutiv aktive IL-23R Variante generiert werden. Dafür wurden weitere chimäre Rezeptoren, bestehend aus Anteilen des humanen IL-23R und des humanen IL-7R mit Insertion der 4 Aminosäuren „PPCL“, kloniert. Nach Transduktion und stabiler Expression in Ba/F3-Zellen konnte eine ligandenunabhängige, konstitutive Aktivität der chimären IL-23R-Variante sowie eine Homodimerisierung des IL-23R in Stimulations- und Proliferationsanalysen beobachtet werden.

Summary

Interleukin 23 (IL-23) is a pro-inflammatory cytokine of the IL-12 family that is involved in the defense against bacterial pathogens and fungal infections. However, hyperactivity of IL-23 can also contribute to the development of autoimmune diseases such as psoriasis, multiple sclerosis, chronic inflammatory bowel disease (IBD) or rheumatoid arthritis. IL-23 transmits its signals via a heterodimeric receptor consisting of IL-12R β 1 and IL-23R. After binding to the receptor, the JAK/STAT (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription) signaling pathway is activated. The activated JAKs phosphorylate tyrosine residues in the intracellular domain of IL-23R, which in turn serve as a binding site for signaling proteins such as STAT3 or SHP2. STATs induce, among other things, the transcription of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins, which inhibit the original cytokine signal by interacting with the receptor in a negative feedback mechanism. Despite an increase in SOCS3 expression in cells after IL-23 mediated signal transduction, there is no negative regulation of the JAK/STAT cascade, in contrast to the IL-6 and gp130 mediated signaling pathway. The aim of this work was to establish a SOCS3-mediated inhibition of the IL-23 signal. For this purpose, chimeric human IL-23R-gp130 receptor variants were cloned, which were examined in transduced Ba/F3 cells with regard to their proliferation and STAT3 activation behavior. The results of these studies suggest that SOCS3-mediated inhibition of IL-23 signaling by chimeric IL-23R is possible. In addition, a different proliferation behavior of the chimeric receptors was observed, which is most likely due to changes in the motif “WLYED-IPN” around tyrosine 397 of IL-23R. The results support the hypothesis that Y397 mediates activation of the MAPK pathway and thus STAT3-independent cell proliferation. In addition to investigating the effect of SOCS3 on IL-23 induced STAT3 activation, a ligand-independent, constitutively active IL-23R variant was to be generated. To this end, additional chimeric receptors composed of portions of the human IL-23R and human IL-7R, with an insertion of the four amino acids “PPCL”, were cloned. Following transduction and stable expression in Ba/F3 cells, ligand-independent, constitutive activity of the chimeric IL-23R variant as well as homodimerization of IL-23R was observed in stimulation and proliferation assays.

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden nicht aufgeführt sind Abkürzungen oder Bezeichnungen von Aminosäuren, Enzymen, Elementen und chemischen Verbindungen, die nach den IUPAC und IUBMB Nomenklaturen definiert sind. Nicht gelistet sind außerdem Maßeinheiten, die im internationalen Einheitensystem (SI) aufgeführt sind (sowie im Duden festgelegt Abkürzungen). Aus dem Englischen übernommene Begriffe sind in der Regel kursiv geschrieben.

AK	Antikörper	FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie	FCS	fetales Kälberserum
APS	Ammoniumpersulfat	FNIII	<i>fibronectin type III</i>
AS	Aminosäure	FP	<i>forward primer</i>
bp	Basenpaare	h	human
BSA	bovines Serumalbumin	IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>	ICD	intrazelluläre Domäne
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen	IFN	Interferon
CHR	<i>cytokine binding homology region</i>	Ig	Immunglobulin
CIA	<i>collagen induced arthritis</i>	IL	Interleukin
CIS	<i>cytokine inducible SH2 protein</i>	ILC	<i>innate lymphoid cell</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>	JAK	Januskinase
DC	Dendritische Zelle	KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LB	Luria-Bertani
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	m	murin
DTT	Dithiothreitol	MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>	MS	Multiple Sklerose
EBI3	<i>Eppstein-Barr virus induced gene 3</i>	OSM	<i>oncostatin M</i>
ECD	extrazelluläre Domäne	p	phosphoryliert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
		PI3K	<i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
		PNK	<i>polynucleotide kinase</i>

PVDF	Polyvinylidenfluorid	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
R	Rezeptor	S1	<i>solution 1</i>
RA	rheumatoide Arthritis	S2	<i>solution 2</i>
RP	<i>reverse primer</i>	S3	<i>solution 3</i>
RT	Raumtemperatur	TAE	Tris-Acetat EDTA
s	<i>soluble</i>	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>	TEMED	Tetramethylethylendiamin
SDM	<i>site-directed mutagenesis</i>	TF	Transkriptionsfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat	T_H	T-Helferzellen
SH2	<i>Src-homology 2</i>	TMD	Transmembrandomäne
SHP2	<i>SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2</i>	T_{reg}	regulatorische T-Zellen
sIL-6Rα	<i>soluble IL-6 receptor</i>	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>	TYK2	Tyrosinkinase 2
SOE	<i>splicing by overlap extension</i>	UE	Untereinheit
SSI	<i>STAT induced STAT inhibitor</i>	WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems	1
1.2	Signalhemmung durch SOCS Proteine	3
1.3	Die Interleukin-12 Familie.....	4
1.4	Charakterisierung von IL-23	7
1.5	Die Gemeinsamkeit der IL-6 Familie: gp130 Rezeptor.....	10
1.6	Konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren	11
1.7	Ziele der Arbeit	13
2	Material & Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Antibiotika	15
2.1.2	Antikörper.....	15
2.1.3	Chemikalien.....	17
2.1.4	Enzyme	18
2.1.5	Geräte.....	19
2.1.6	Kits.....	21
2.1.7	Lösungen und Puffer	21
2.1.8	Marker	23
2.1.9	Medien.....	24
2.1.10	Oligonukleotide	24
2.1.11	Plasmide.....	26
2.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.13	Zelllinien.....	28
2.1.14	Zytokine.....	29
2.2	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	29
2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.3	Konzentrationsmessung DNA	31
2.2.4	Sequenzierung	31
2.2.5	Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA	31
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	32

2.2.7	Gelextraktion	32
2.2.8	Phosphorylierung von DNA	32
2.2.9	Dephosphorylierung von DNA.....	32
2.2.10	Ligation.....	32
2.2.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.3	Zellbiologische Methoden.....	36
2.3.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	36
2.3.2	Kultivierung von Suspensionszellen	36
2.3.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	37
2.3.4	Generierung stabiler Zelllinien durch retrovirale Transduktion.....	37
2.3.5	Kryokonservierung von Zellen.....	38
2.3.6	Proliferationsassay mit Ba/F3-Zellen	38
2.3.7	Stimulationsassay mit stabilen Zelllinien	38
2.3.8	Stimulationsassay mit transienten Zelllinien	39
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten stark adhärenter Zellen	39
2.4.2	Herstellung von Zelllysaten schwach adhärenter Zellen	39
2.4.3	Herstellung Zelllysate stabiler Ba/F3-Zelllinien	40
2.4.4	Pierce BCA Protein Assay.....	40
2.4.5	Western Blot	40
2.4.6	Entfernung eines Antikörpers von Membranen.....	41
2.4.7	Durchflusszytometrie.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Chimäre IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten	42
3.1.1	Klonierung der IL-23R-gp130 Varianten in pMOWS-Vektoren	49
3.1.2	Expression der Rezeptorvarianten in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien...	52
3.1.3	Funktionelle Charakterisierung der erzeugten Ba/F3-Zelllinien	55
3.1.4	Chimäre IL-23R-gp130 Varianten induzieren SOCS Suppression	57
3.2	Chimäre IL-23 Rezeptorvarianten mit SOCS3 Bindemotiven	61
3.2.1	Klonierung von IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 Vektoren	63
3.2.2	Expression der Rezeptorvarianten in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien...	67
3.3	Alternative IL-12R β 1 Rezeptorvariante mit SOCS3-Motiv	71
3.3.1	Klonierung des IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 Expressionsvektors	72

3.3.2	Erzeugung stabiler Ba/F3-Zelllinien mit dem chimären IL-12R β 1	74
3.4	Klonierung von p409-SOCS3 Δ PEST-FLAG-HA-myc	78
3.5	Erzeugung eines konstitutiv-aktiven IL-23 Rezeptors.....	80
3.5.1	Klonierung des Expressionsvektors p409-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL	80
3.5.2	Expression des Rezeptors in Ba/F3-gp130 Zelllinien	83
3.5.3	Chimäre IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL Variante ist konstitutiv aktiv	85
4	Diskussion	88
4.1	Chimäre IL-23R Varianten weisen unterschiedliche Proliferationsmuster auf	88
4.2	Chimäre IL-23R führen zu SOCS3 vermittelter STAT3 Inhibierung.....	90
4.3	Insertion von PPCL führt zur konstitutiven Aktivität des IL-23R.....	94
4.4	Homodimerisierung von IL-23R nach Stimulation mit IL-23	96
4.5	Ausblick	97
5	Literatur- und Quellenangaben.....	99
6	Anhang	110
6.1	Vektorkarten.....	110
6.2	Durchflusszytometrie	116
6.3	Western Blot	117

1 Einleitung

1.1 Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems

Zytokine sind Signalproteine mit vielfältigen Funktionen. Sie dienen unter anderem als Botenstoffe innerhalb des Immunsystems und haben pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften [1]. Anders als Hormone werden Zytokine von unterschiedlichen Zellarten synthetisiert und entfalten ihre Wirkung meist auto- oder parakrin, membrangebunden juxtakrin oder werden sezerniert und wirken endokrin [2]. Zur Signaltransduktion binden sie als Ligand an spezifische membranständige Rezeptoren (R) und regulieren ferner die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der Zielzellen. Bei fehlgeleiteter Immunantwort spielen Zytokine jedoch auch eine wichtige Rolle bei Autoimmun- sowie Krebserkrankungen [3]. Des Weiteren steuern Zytokine embryonale Prozesse und sind an der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase beteiligt [4].

Zytokine können anhand ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt werden, darunter fallen die Interleukine (IL), Interferone (IFN), Chemokine und Wachstumsfaktoren. Weitere Einteilungen erfolgen nach Struktur der Zytokine oder Homologien der Rezeptoren. Die zugehörigen Rezeptoren werden anhand struktureller Gemeinsamkeiten in sieben Gruppen unterteilt: Tyrosinkinaserzeptoren, Serin-/Threoninkinaserzeptoren, Chemokinrezeptoren, Tumornekrosefaktorrezeptoren, Rezeptoren der IL-1 und IL-17 Familie, sowie Klasse I und II Zytokinrezeptoren [5]. Die Klasse I Zytokinrezeptoren (Hämatopoetinrezeptoren) machen dabei den größten Anteil aus. Alle zugehörigen Rezeptoren weisen extrazellulär eine *cytokine-binding homology region* (CHR) aus zwei *fibronectin type III* (FNIII)-Domänen auf, worüber die Interaktion mit dem Zytokin erfolgt. Die CHRs sind geprägt von vier konservierten Cysteinresten Amino (N)-terminal, die Disulfidbrückenbildungen ermöglichen. Carboxy (C)-terminal findet sich das „WSXWS“-Motiv, das zur Rezeptorstabilisierung und -faltung beiträgt. Zusätzlich können Klasse I Rezeptoren weitere FNIII-Domänen sowie Immunglobulin (Ig) ähnliche Domänen im extrazellulären Anteil (ECD) aufweisen [6-10]. Mitglieder dieser Rezeptorfamilie besitzen keine eigene Kinaseaktivität und sind zur Signaltransduktion deshalb auf intrazellulär assoziierte Januskinasen (JAK) angewiesen [11]. Zytokinbindung an den Rezeptoren führt zu einer räumlichen Veränderung der Rezeptorstruktur, wodurch eine Transphosphorylierung und somit Aktivierung der assoziierten Kinasen ausgelöst wird (Abb. 1). Aktivierte JAKs initiieren wiederum intrazelluläre Signalwege wie

JAK/ *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-, *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K)-pathway und weitere [11, 12].

Besonders relevant für die Signaltransduktion der Klasse I Zytokinrezeptoren ist der JAK/STAT-Signalweg (Abb. 1). Die vier bekannten Januskinasen 1-3 (JAK) bzw. Tyrosinkinase 2 (TYK2) interagieren über Box-Motive im membranproximalen intrazellulären Abschnitt (ICD) des Rezeptors. Aktivierte JAKs phosphorylieren intrazelluläre Tyrosinreste am Rezeptor [13, 14]. Die phosphorylierten (p) Tyrosinreste fungieren als Bindestelle für STAT Proteine. Es sind sieben STAT Proteine bekannt, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Über eine C-terminale *Scr homology 2* (SH2)-Domäne binden diese an phosphorylierte Tyrosinreste und werden somit ebenfalls durch die JAKs phosphoryliert. Anschließend dimerisieren die STAT Proteine und gelangen in den Zellkern [15, 16]. Hier binden diese über eine zentrale konservierte Region innerhalb des STAT Proteins an die Desoxyribonuklease (DNA) und wirken als Transkriptionsfaktoren (TF) [17].

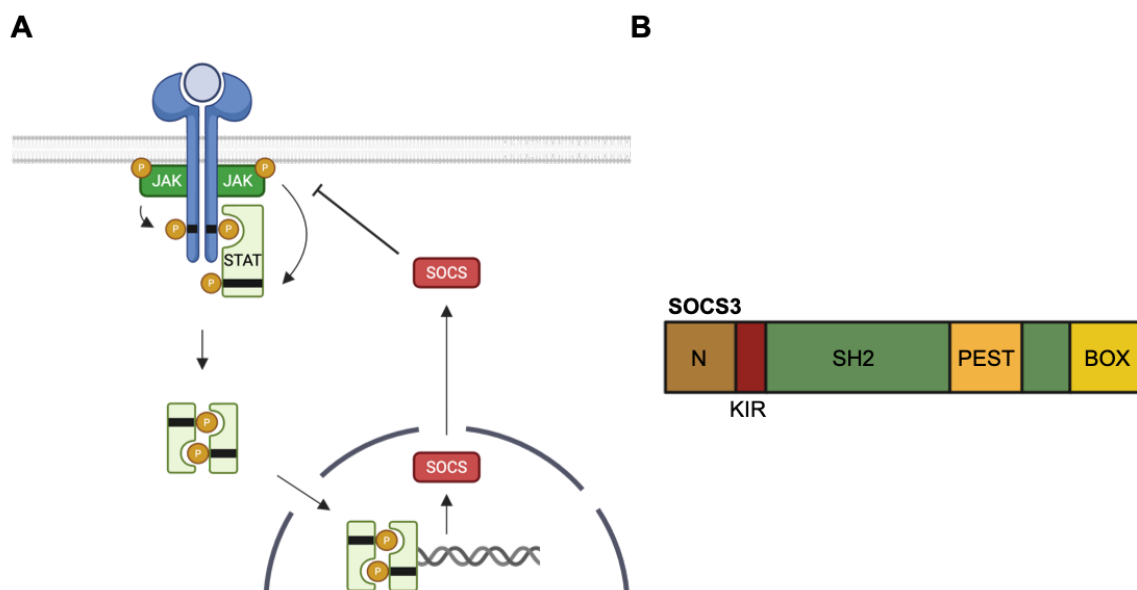


Abb. 1: Schematische Übersicht des JAK/ STAT-Signalwegs und SOCS3. (A) Aktivierung des JAK/ STAT-Signalwegs. Zytokinbindung führt zu Dimerisierung des Rezeptors und anschließender Transphosphorylierung assoziierter Januskinasen (JAK). Aktivierte JAKs phosphorylieren wiederum intrazelluläre Tyrosinreste, die dann als Bindestelle für STAT dienen. Auch diese werden phosphoryliert, dimerisieren und gelangen als Transkriptionsfaktor in den Zellkern. Dort induzieren sie die Transkription u.a. von SOCS Proteinen, die das Zytokinsignal in einer negativen Rückkopplungsschleife hemmen. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [6, 18]. **(B)** Schematische Übersicht von SOCS3. Über die zentrale SH2-Domäne (grün) interagiert SOCS3 mit phosphorylierten Substraten. Innerhalb der SH2-Domäne findet sich ein „PEST“-Motiv (orange), das die Proteininstabilität beeinflusst. Die SOCS Box (gelb) am C-terminalen Ende von SOCS3 vermittelt den Abbau phosphorylierter Bindungspartner über das Proteasom. N-terminal (braun) findet sich außerdem die *kinase inhibitory region* (KIR, rot), mithilfe dessen die Aktivität der JAK direkt inhibiert wird. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [19, 20].

1.2 Signalhemmung durch SOCS Proteine

STATs induzieren unter anderem die Transkription und Aktivierung von *suppressor of cytokine signaling* (SOCS), auch bekannt als *cytokine inducible SH2 protein* (CIS) oder *STAT-induced STAT inhibitor* (SSI) [21-23]. Die SOCS Familie besteht aus acht Mitgliedern (SOCS1-7 & CIS), wovon insbesondere CIS und SOCS1-3 in JAK/STAT-Signalwegen relevant sind [6, 24]. SOCS Proteine hemmen das Zytokinsignal in einem negativen Rückkopplungsmechanismus (Abb. 1). Dies ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der physiologischen Zellfunktion. Somit wird eine übermäßige und anhaltende Signaltransduktion verhindert, die ansonsten zu chronischer Entzündung mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, sowie vermehrter Zellproliferation und Tumorigenese führen kann [25]. Abhängig von Zytokin und aktiviertem STAT werden unterschiedliche SOCS Proteine transkribiert [18]. CIS wird dabei insbesondere von Erythropoetin, IL-2, IL-3 und IL-5 in STAT5-abhängigen Signalwegen induziert; SOCS1 von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-7 [26, 27]. SOCS3 hemmt vor allem STAT3 und interagiert mit gp130-verwandten Zytokinrezeptoren [18].

Strukturell zeigen alle SOCS Proteine eine zentrale SH2-Domäne, welche zur Interaktion mit phosphorylierten Substraten benötigt wird (Abb. 1). SOCS1 bindet über SH2 direkt an die aktive Januskinase, wohingegen CIS, SOCS2 und SOCS3 an phosphorylierte Tyrosinreste in der ICD des Rezeptors binden [18, 28]. Darüber hinaus besitzen alle SOCS Proteine ein C-terminales Motiv konservierter Aminosäuren mit hoher Sequenzsimilarität, die sogenannte SOCS Box [22, 24]. Die SOCS Box interagiert mit Elongin B/C [29, 30], das wiederum Cullin5 rekrutiert. Cullin5 liegt in einem Komplex mit der Ringfingerdomäne Rbx2 vor und bildet die Grundlage der Ubiquitin-Ligase E3 Aktivität. Phosphorylierte Bindungspartner der SOCS Proteine werden durch die Ligase ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut [31, 32]. Obwohl SOCS1 und SOCS3 Zytokinsignale am effektivsten hemmen, binden diese Cullin5 mit niedrigerer Affinität als die restlichen SOCS Proteine [32]. SOCS1 und SOCS3 besitzen jedoch eine zusätzliche besondere Struktureigenschaft: die N-terminale *kinase inhibitory region* (KIR). Mithilfe dessen können sie die enzymatische Aktivität der JAK direkt inhibieren [28, 33]. Über die SH2-Domäne interagieren SOCS1 und SOCS3 mit der JAK, wodurch die KIR-Domäne die Substratbindungsgrube der JAK blockiert. Die Bindung von SOCS3 an den Rezeptor bleibt dabei unberührt [34]. Voraussetzung für diese Art der Inhibition ist ein „GQM“-Motiv in der Aminosäuresequenz der Kinase. Das Motiv fehlt bei JAK3, weshalb nur JAK1, JAK2 und TYK2 durch die KIR-Domäne beeinflusst werden [35]. Innerhalb der SH2-Domäne findet sich bei SOCS3 zudem eine

35 AS umfassende „PEST“-Domäne [36]. „PEST“-Domänen weisen die AS Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) auf und modulieren die Proteinstabilität [37]. Deletion der „PEST“-Domäne führt zu einem verminderten Abbau von SOCS3 [20]. Die Bindung an phosphorylierte Tyrosine und Hemmung der STAT3 Aktivität durch SOCS3 wird durch die Deletion nicht wesentlich verändert [20, 36]. Neben SOCS3 besitzen vermutlich noch weitere SOCS Proteine eine „PEST“-Domäne, darunter CIS, SOCS1, -5 und -7 [36].

1.3 Die Interleukin-12 Familie

Zur Interleukin-12 Familie zählen fünf Mitglieder – IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39, respektive sechs inklusive des synthetischen IL-Y [2]. Die Gemeinsamkeit dieser Zytokine besteht darin, dass sie einen heterodimeren Zytokinaufbau aus einer α - sowie einer β -Untereinheit (UE) aufweisen (Abb. 2) [38]. Die Helices der α -Untereinheiten IL-23p19, IL-27p28 und IL-12p35 sind in einer „up-up-down-down“ Struktur angeordnet, die β -Untereinheiten IL-12p40 und *Epstein-Barr virus induced-gene 3* (EBI3) bestehen dagegen aus zwei FNIII-Domänen. IL-12p40 besitzt zusätzlich eine N-terminale Ig-ähnliche Domäne [39]. Der Aufbau der α -Untereinheiten ähnelt der Struktur von IL-6, der Aufbau der β -Untereinheiten ähnelt der Struktur von löslichen Klasse I Zytokinrezeptoren wie des löslichen IL-6 Rezeptors (sIL-6R α) [40].

Durch Kombination der Untereinheiten ergeben sich die Mitglieder der IL-12 Familie: IL-12 aus IL-12p35 und IL-12p40 [41, 42]; IL-23 aus IL-23p19 und IL-12p40 [43]; IL-27 aus IL-27p28 und EBI3 [44]; IL-35 aus IL-12p35 und EBI3 [45]; sowie IL-39 aus IL-23p19 und EBI3 bestehend (Abb. 2A) [46-48]. Die Untereinheiten von IL-12 und IL-23 sind dabei über Disulfidbrücken miteinander verbunden [41, 43]. Dagegen weisen die Untereinheiten von IL-27 und IL-35 ein nicht-kovalentes Bindungsmuster auf [45, 49]. Mittels synthetischer Fusion von IL-27p28 und IL-12p40 konnte ein weiteres mögliches Mitglied, IL-Y, mit biologischer Aktivität generiert werden [50, 51]. Trotz des besonderen heterodimeren Aufbaus der IL-12 Zytokinfamilie ist IL-12p40 auch als Homodimer sowie als Monomer bekannt [52-54]. Desweiteren sind folgende weitere Monomere beschrieben: IL-27p28, respektive IL-30, [52, 55], IL-12p35 und EBI3 [52, 56].

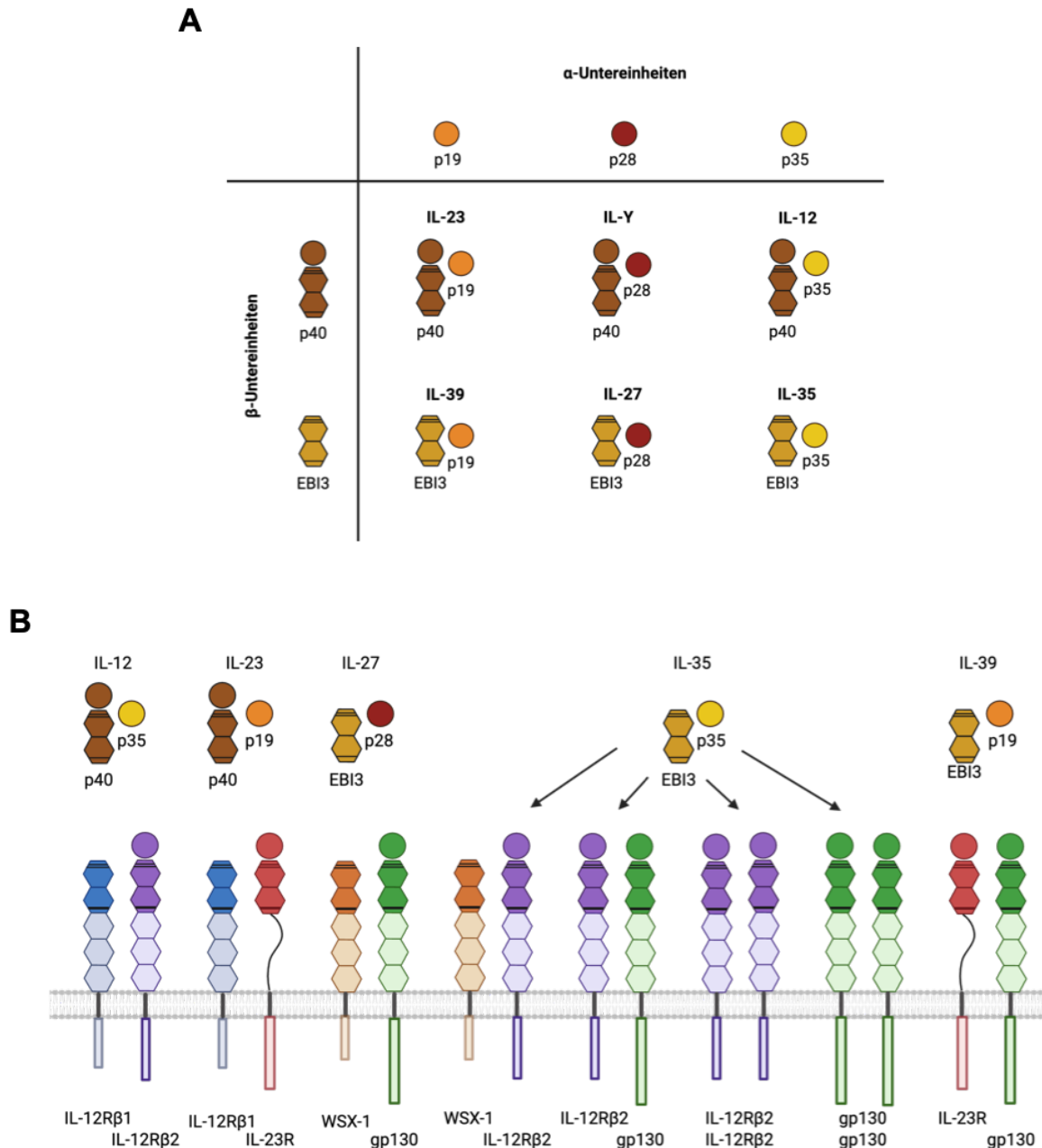


Abb. 2: Schematische Übersicht der IL-12 Familie sowie zugehörige Rezeptoren. (A) Aufbau der Zytokine der IL-12 Familie. Zur IL-12 Familie zählen die heterodimeren Zytokine IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39. Sie sind aus einer α -Untereinheit (UE) (p19, p28, p35) sowie einer β -UE (p40, EBI3) zusammengesetzt und binden an entsprechende hetero- oder homodimere Rezeptoren. IL-Y stellt ein weiteres mögliches Mitglied dar. Es wurde bisher allerdings nur synthetisch nachgewiesen. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [2]. **(B)** Schematische Übersicht über die Rezeptoren der IL-12 Familie. Die Rezeptoren sind durch Kombination der Untereinheiten IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R, WSX-1 und gp130 aufgebaut. Wie bei Klasse I Zytokinrezeptoren üblich, finden sich FNIII-Domänen (Sechsecke) membranproximal (hell) und bilden die *cytokine-binding homology region* membrandistal (dunkel). Anstatt FNIII-Domänen membranproximal findet sich beim IL-23R eine unstrukturierte *stalk region*. Das „WSXWS“-Motiv ist als dicker Strich, die konservierten Cystein-Reste als dünne Striche innerhalb der FNIII-Domänen dargestellt, die Ig-ähnlichen Domänen als Kreise. Gleiches gilt für die β -Untereinheit der Zytokine. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [2, 7].

Die Signalübertragung der IL-12 Familie erfolgt über Klasse I Zytokinrezeptoren. Analog der beschriebenen Interleukine sind auch die Rezeptoren der IL-12 Familie aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut: IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R, WSX-1 und gp130 (Abb. 2B). Durch Kombination der Untereinheiten ergeben sich hetero- oder homodimere Rezeptoren [2, 57]. Die Rezeptoreinheit gp130 ist gleichzeitig essenziell für die Signaltransduktion innerhalb der IL-6 Familie und stellt deren gemeinsames Merkmal dar. Beide Gruppen werden deshalb häufig unter der IL-6/IL-12 Superfamilie zusammengefasst [58]. Die Signaltransduktion von IL-12 erfolgt über IL-12R β 1 in Kombination mit IL-12R β 2 [59], die Signaltransduktion von IL-23, entsprechend der gleichen β -Untereinheit wie IL-12, über IL-12R β 1 sowie IL-23R [60]. IL-27 vermittelt über WSX-1 sowie gp130 [61], IL-39 über IL-23R in Kombination mit gp130 [46]. Dagegen scheint es für IL-35 vier verschiedene Rezeptorkomplexe zu geben: WSX-1/IL-12R β 2, IL-12R β 2/gp130, IL-12R β 2/IL-12R β 2 und gp130/gp130 (Abb. 2) [57, 62].

Obwohl die IL-12 Zytokine sowie die Rezeptoren strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen, unterscheiden sich die Wirkungen an den Zielzellen doch erheblich [39]. IL-12 wird im Rahmen der unspezifischen Immunantwort von dendritischen Zellen (DC) sowie Phagozyten gebildet und induziert wiederum die Differenzierung und IFN- γ Produktion von Typ1-T-Helferzellen (T_H1) [63, 64]. Auch IL-23 wird von dendritischen Zellen sowie Makrophagen gebildet und bewirkt die Differenzierung von Typ17-T-Helferzellen (T_H17), sowie die Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen und *innate lymphoid cells* (ILCs), was zur Entstehung weiterer Zytokine wie IL-17, IL-22 und TNF α führt [65]. Sowohl IL-12 als auch IL-23 haben somit bedeutende pro-inflammatorische Eigenschaften. IL-27 kann pro- als auch anti-inflammatorisch wirken [66]. Es wird von Antigen-präsentierenden Zellen synthetisiert und induziert ebenso wie IL-12 die Differenzierung von naiven T-Helferzellen (T_H0) zu IFN- γ produzierenden T_H1-Zellen [44]. Allerdings kann IL-27 auch pro-inflammatorische T_H17-Zellen hemmen, sowie IL-10 sekretierende anti-inflammatorische regulatorische T-Zellen aktivieren [67, 68]. Darüber hinaus stimuliert IL-27 regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die eine T_H1-Zellaktivität vermindern [69]. Ausschließlich anti-inflammatorische Eigenschaften hat dagegen IL-35. Es wird von T_{reg}-Zellen sezerniert und unterstützt gleichzeitig dessen inhibitorischen Aufgaben [70]. Zudem induziert IL-35 regulatorische T-Zellen (iT_R-35), als auch regulatorische B-Zellen, welche Immunreaktionen hemmen [71, 72].

1.4 Charakterisierung von IL-23

IL-23 vermittelt seine Signale über einen heterodimeren Rezeptor aus IL-12R β 1 und IL-23R (Abb. 3) [60]. IL-12R β 1 besteht extrazellulär aus fünf FNIII-Domänen, dabei bilden D1 und D2 membrandistal die CHR. Diese dient als Bindestelle für die IL-12p40 Untereinheit von IL-23 sowie IL-12 [73]. Auch IL-23R besitzt extrazellulär eine CHR aus zwei FNIII-Domänen (D2, D3) und eine zusätzlichen Ig-ähnliche Domäne D1. Hierüber findet die Interaktion mit der IL-23p19 Untereinheit von IL-23 statt [60, 73]. Anstatt der drei membran-proximalen FNIII-Domänen gibt es im IL-23R eine unstrukturierte *stalk region*. Mithilfe dessen wird ein bestimmter Abstand zwischen CHR und Plasmamembran eingehalten, was eine physiologische Signaltransduktion ermöglicht. Deletion der *stalk region*, sowie Deletion der gesamten ECD führt zu Homodimerisierung und konstanter Aktivität des Rezeptors [74].

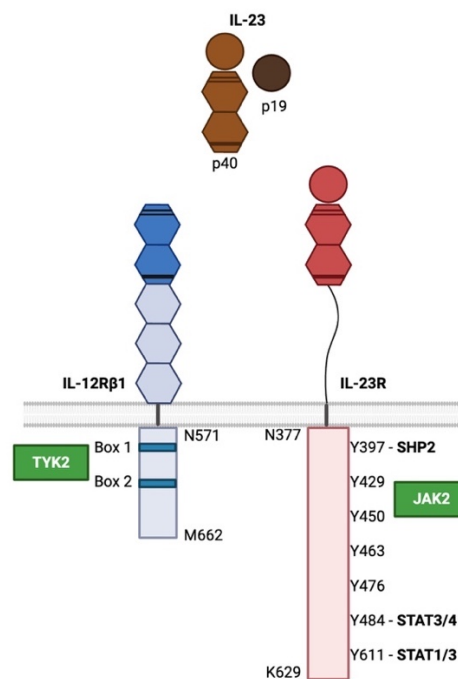


Abb. 3: Aufbau des IL-23 Rezeptorkomplexes. IL-23 vermittelt seine Signale über einen heterodimeren Rezeptor aus IL-12R β 1 und IL-23R. IL-12R β 1 besitzt fünf FNIII-Domänen (Sechsecke), IL-23R nur zwei, verfügt jedoch über eine zusätzliche Ig-ähnliche Domäne (Kreis) und eine unstrukturierte *stalk region*. Box-Motive sind in der ICD des IL-12R β 1 vorhanden, Box 1 zwischen Aminosäure (AS) L577 bis C585, Box 2 zwischen AS V618 und E630. Hierüber interagiert TYK2 mit IL-12R β 1. JAK2 dagegen bindet an den IL-23R, vermutlich zwischen E436 und E459. Tyrosinreste finden sich ausschließlich in der ICD des IL-23R, davon bindet Y397 SHP2, Y484 STAT3/4 und Y611 STAT1/3. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [2, 75].

Der IL-23 Rezeptor zählt zu den Klasse I Zytokinrezeptoren und hat somit keine eigenständige Kinaseaktivität. Für die Signaltransduktion nach Bindung von IL-23 sind intrazellulär assoziierte Januskinasen verantwortlich [2, 76]. Dabei interagiert TYK2 mit IL-12R β 1, JAK2 dagegen mit dem IL-23R (Abb. 3) [60, 77]. Für die Interaktion zwischen Rezeptor

und Januskinasen sind membranproximale Box-Motive im intrazellulären Abschnitt des Rezeptors relevant [13, 14]. Dabei vermittelt Box 1 die Bindung der JAKs, während Box 2 bei der Aktivierung der JAKs und der Signaltransduktion eine Rolle spielt [75, 78]. IL-12R β 1 besitzt beide Box-Motive, die Aminosäuresequenz der Box 1 „LCPPLTPC“ befindet sich im humanen Rezeptor zwischen L577 und C585, die Sequenz der Box 2 „VVEMSWDKGERTE“ zwischen V618 und E630. Beide Box-Motive des IL-12R β 1 sind für eine Signaltransduktion nach Stimulation mit IL-23 wichtig, wobei eine Deletion der Box 2 weiterhin eine Restaktivität zulässt. Auch die Assoziation von IL-12R β 1 mit TYK2 ist nicht obligat, sondern kann durch JAK1 ersetzt werden [75]. Erstaunlicherweise gibt es im IL-23R keine Box-Motive, jedoch findet sich eine hoch konservierte Region „IKRRILLIPKWLYE“ im intrazellulären Abschnitt I384 bis E398. Diese Sequenz stellt möglicherweise eine unübliche Bindungsstelle für JAK2 dar [79]. Allerdings konnte in fortführenden Analysen des murinen IL-23R gezeigt werden, dass trotz Deletion der postulierten JAK2 Bindestelle weiterhin eine Interaktion zwischen IL-23R und JAK2 möglich ist. Bei Übertragung der Ergebnisse auf den humanen (h) IL-23R ist der Abschnitt zwischen E436 und E459 für eine Interaktion mit JAK2 relevant, auch wenn diese mögliche Bindestelle, anders als die Box-Motive, deutlich distaler von der Membran entfernt liegt. Dieser Sequenzbereich ist für die Aktivierung von JAK2 alleinig jedoch nicht ausreichend, dafür benötigt es weitere Aminosäuresequenzen, vermutlich den Bereich T460 bis G483 sowie Y397 und R381 [75].

Für die weitere Signaltransduktion phosphorylieren aktivierte JAKs Tyrosinreste in der ICD des Rezeptors. Diese dienen als Bindestellen für Signalproteine, wodurch unterschiedliche Signalkaskaden initiiert werden [80]. Die ICD des murinen IL-12R β 1 weist ein Tyrosin auf, in der Struktur des humanen IL-12R β 1 finden sich jedoch keine intrazellulären Tyrosine [2]. Dennoch ist der humane IL-12R β 1 essenziell für die Signaltransduktion. Nur bei Vorhandensein beider Rezeptoren, IL-12R β 1 und IL-23R, kommt es zu einer Zellproliferation und Aktivierung intrazellulärer Effektorproteine [81]. In der ICD des IL-23R sind dagegen sieben Tyrosinreste vorhanden: Y397, Y429, Y450, Y463, Y476, Y484 und Y611 (Abb. 3) [60]. „Y³⁹⁷EDI“ ist dabei wichtig für die Bindung von *SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2* (SHP2), das wiederum die PI3K/Akt- sowie die MAPK-Kaskade auslöst [60, 81]. Beide Signalkaskaden sind für eine STAT-unabhängige Zellproliferation verantwortlich [81]. Für die Phosphorylierung von *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2), einem *downstream* Protein im MAPK-Weg, wird im murinen IL-23R jedoch noch ein zusätzliches C-terminales Motiv benötigt, gleiches gilt vermutlich für den humanen

IL-23R [81]. Ähnlich wie im IL-12 Signalweg werden auch im IL-23 Signalweg STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 durch JAK2/ TYK2 aktiviert, vorherrschend jedoch STAT3 und weniger STAT4 [43, 60]. Angenommen wird, dass STAT4 an die Sequenz „GY⁴⁸⁴KPQIS“ bindet, da es dem STAT4 Bindemotiv im IL-12R β 2 ähnelt [60, 82, 83]. Vermutlich interagiert Y484 zusätzlich aber auch mit STAT3 [2]. „Y⁶¹¹FPQ“ dient als Bindestelle für STAT3 und potenziell auch STAT1, darüber hinaus muss es im IL-23R allerdings weitere Motive geben, die eine STAT3 Aktivierung induzieren [60, 81, 84].

STAT Proteine wirken als Transkriptionsfaktoren und führen unter anderem zur Expression von SOCS Proteinen, die in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die Signaltransduktion hemmen. SOCS3 inhibiert dabei insbesondere die Aktivität von STAT3, im IL-12 Signalweg auch STAT4 [18, 85]. Obwohl die SOCS3 Konzentration in Ba/F3-Zellen mit IL-23R und IL-12R β 1 nach IL-23 Stimulation ansteigt, wird die STAT3 Phosphorylierung davon nicht beeinflusst, weiterhin kann eine gleich hohe Aktivität von STAT3 nachgewiesen werden [81, 86]. Hierzu gibt es jedoch unterschiedliche Beobachtungen. In anderen Untersuchungen kommt es bei fehlendem SOCS3 in T-Zellen zu einer erhöhten STAT3 Aktivierung sowie einer vermehrten T_H17-Zelldifferenzierung nach IL-23 Stimulation [87].

IL-23 hat pro-inflammatorische Eigenschaften und wird im Rahmen der *innate immunity* von aktivierten Makrophagen und DCs produziert. Es wirkt insbesondere auf T_H0-, aber auch auf $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie ILCs, was unter anderem zur Sekretion von IL-17, IL-22, TNF α und IFN γ führt. Durch seine Wirkungsweise verbindet IL-23 somit das angeborene und erworbene Immunsystem miteinander [65]. T_H0-Zellen differenzieren nach IL-23 Stimulation zu T_H17-Zellen, welche wiederum IL-17 ausschütten [88-90]. IL-17 induziert weitere pro-inflammatorische Zytokine, weshalb die IL-23/ IL-17-Achse innerhalb des Immunsystems essenziell in der Bekämpfung bakterieller Erreger und Pilzinfektionen ist [91, 92]. Trotz dieser protektiven Abwehrfunktion kann es bei einer Dysregulation des Zusammenspiels von IL-23 und IL-17 zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen [93]. Unter anderem ist IL-23 an der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) bzw. dem entsprechenden Mausmodel *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE), chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), Psoriasis sowie rheumatoider Arthritis (RA) bzw. dem entsprechenden Mausmodel *collagen-induced arthritis* (CIA) beteiligt [94-100]. Desweiteren fördert IL-23 die Tumorentstehung und -wachstum, zeigt gleichzeitig jedoch auch Tumor-hemmende Effekte in Überexpressionsstudien [101, 102].

1.5 Die Gemeinsamkeit der IL-6 Familie: gp130 Rezeptor

Zytokine der IL-6 Familie vermitteln ihre Signale charakteristischerweise über einen hetero- bzw. homodimeren Rezeptorkomplex mit wenigstens einer gp130 Rezeptoreinheit. Darunter fallen IL-6, IL-11, IL-27, IL-35, IL-39, *oncostatin M* (OSM), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin 1* und *cardiotrophin-like cytokine factor 1* [103]. IL-27, IL-35 sowie IL-39 werden aufgrund ihres heterodimeren Zytokinaufbaus gleichzeitig der IL-12 Familie zugeordnet [58].

Gp130 zählt zu den Klasse I Zytokinrezeptoren und besitzt extrazellulär, ähnlich wie der IL-23R, eine Ig-ähnliche Domäne D1, sowie eine CHR aus zwei FNIII-Domänen D2 und D3 (Abb. 4). Zudem finden sich drei weitere FNIII-Domänen membranproximal [84, 104]. In der ICD finden sich die zwei Box-Motive, Box 1 „IWPNVDP“ erstreckt sich von AS I651 bis P658, Box 2 „VSVVEIEANDKK“ von AS V691 bis P702 [13]. Vor allem JAK1, aber auch JAK2 und TYK2 interagieren darüber mit gp130 und phosphorylieren nach Aktivierung wiederum intrazelluläre Tyrosinreste [105-107].

Innerhalb der ICD von gp130 befinden sich sechs Tyrosine, wovon Y767, Y814, Y905 sowie Y915 in einer konservierten „YXXQ“-Sequenz vorliegen. Diese Sequenz vermittelt die Interaktion mit STAT3 und im Fall von Y905 und Y915, die ein „YXPQ“-Motiv aufweisen, in geringerem Ausmaß auch mit STAT1 [108]. Y759 dient als Bindestelle für SHP2, das zur Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalwegs führt [84, 109, 110]. Gleichzeitig interagiert SOCS3 über Y759 mit dem Rezeptor und hemmt darüber den JAK/STAT-Weg in einem negativen Rückkopplungsmechanismus und führt zu verminderter Aktivierung von SHP2 [111-113]. SOCS3 reduziert die Phosphorylierung und Aktivierung der STATs bereits 30 min nach IL-6 Stimulation [114, 115]. Neben Y759 ist die Sequenz „VQY₇₅₉STVVH“ um das Tyrosin für die Interaktion mit SOCS3 relevant. Insbesondere Valin an Position pY-2, sowie die Valine an Positionen pY+3 und +4, Histidin an Position pY+5 und Glutamin an Position pY-1 erhöhen die Affinität zwischen SOCS3 und Rezeptor [112, 116]. Neben SOCS3 wird nach IL-6 Stimulation zudem auch SOCS1 gebildet, spielt aber eine deutlich geringere Rolle in der Signalhemmung [22, 117].

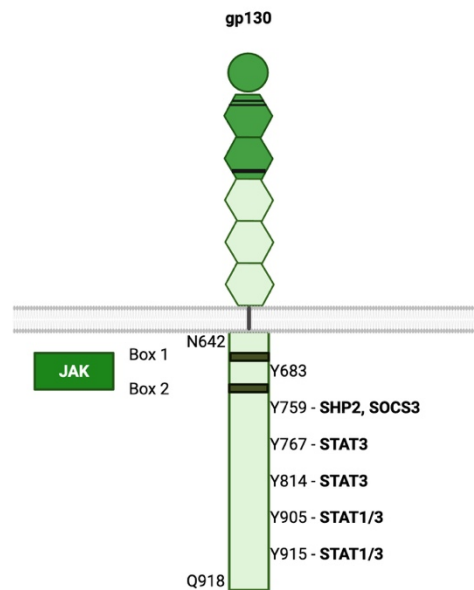


Abb. 4: Schematische Übersicht des gp130 Rezeptors. Neben den charakteristischen FNIII-Domänen (Sechsecke) mit konservierten Cysteinresten (dünne Striche) und „WSXWS“-Motiv (dicke Linie) besitzt gp130 eine Ig-ähnliche Domäne extrazellulär. JAK1 interagiert mit dem Rezeptor über Box 1 von I651 bis P658 und Box 2 von V691 bis K702. Neben den Box-Motiven finden sich sechs Tyrosinreste (Y) in der intrazellulären Domäne. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [84].

Neben gp130 werden weitere Rezeptoreinheiten zur Signaltransduktion innerhalb der IL-6 Familie benötigt. IL-6 als Hauptvertreter dieser Zytokinklasse bindet dabei IL-6R und induziert als Komplex die Homodimerisierung von gp130 [104, 118, 119]. Die Expression von IL-6R ist auf wenige Zellarten beschränkt, wohingegen gp130 in vielen verschiedenen Zellen exprimiert wird. Dennoch kann eine IL-6 Signaltransduktion in Zellen ohne IL-6R stattfinden. Hierbei interagiert die lösliche Form des IL-6R, *soluble* (s)IL-6R, mit IL-6 und membrangebundenem gp130 und ermöglicht die Signaltransduktion mittels *trans-signaling* [104, 107, 118]. Durch limitierte Proteolyse (*shedding*) oder alternatives *splicing* entsteht sIL-6R [120, 121]. Dieser Mechanismus ist insbesondere bei pathologischen Prozessen relevant. Durch *trans-signaling* kann eine Immunreaktion in Zellen ausgelöst werden, die normalerweise nicht IL-6 sensitiv sind [107, 122].

1.6 Konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren

Normalerweise wird ein intrazelluläres Signal erst nach Bindung eines Zytokins an einen zugehörigen Rezeptor ausgelöst, anders verhält es sich allerdings bei konstitutiver Aktivität eines Rezeptors. Hierbei sind intrazelluläre Signalwege auch ohne vorherige Zytokinbindung aktiv [123]. Umlagerung von Chromosomen oder Amplifikation von DNA sowie *gain-of-function* Mutationen und autokrine Zellaktivierung können zu konstitutiv aktiven Zytokinrezeptoren führen und spielen deshalb eine Rolle in der Pathogenese verschiedener

Erkrankungen [5, 124]. Die Relevanz konstitutiv aktiver Zytokinrezeptoren zeigt sich am Beispiel des IL-7R α . IL-7R α ist gemeinsam mit CD132 (γ -chain, γ_c) Bestandteil eines heterodimeren Rezeptors, über den IL-7 Signale vermittelt (Abb. 5) [125]. Darüber hinaus kann IL-7R α auch einen Komplex mit *thymic stromal lymphopoietin receptor* (TSLPR) zur TSLP Signaltransduktion eingehen [126]. In beiden Fällen wird der IL-7R α vor allem auf unreifen sowie reifen T- und B-Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für die physiologische Entwicklung lymphatischer Zellen [127, 128].

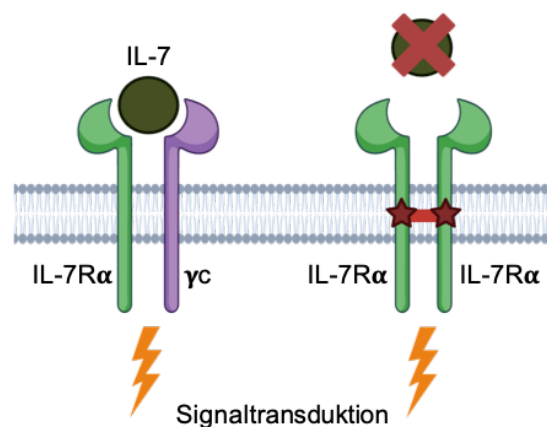


Abb. 5: Schematische Übersicht des IL-7R. IL-7 vermittelt sein Signal über einen heterodimeren Rezeptor bestehend aus IL-7R α und einer γ -chain (γ_c). Mutationen mit Insertion eines Cysteins in der Transmembrandomäne des IL-7R α (roter Stern) führen über Disulfidbrückenbindung (roter Strich) zu einer Homodimerisierung und somit zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivität des Rezeptors. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [129].

Loss-of-function Mutationen im IL-7R α führen zu *severe combined immune deficiency* (SCID) [130]. Dagegen führen somatische *gain-of-function* Mutationen zur Entstehung akuter lymphatischer Leukämien (ALL) bei Kindern. Insbesondere Mutationen mit Insertion eines Cysteins in der ECD oder Transmembrandomäne (TMD) sind dabei relevant [131]. Die Cysteine vermitteln eine intermolekulare Disulfidbrückenbindung und führen somit zur Homodimerisierung und Aktivierung des IL-7R α ohne die Verwendung der γ -chain (Abb. 5) [131]. Unter anderem wurde dabei die Insertionssequenz Prolin-Prolin-Cystein-Leucin („PPCL“) innerhalb der TMD identifiziert, die eine Homodimerisierung und konstitutive Aktivität des Rezeptors auslöst [131-133]. In weiteren Untersuchungen konnte die konstitutive Aktivität des IL-7R α *in vitro* im Rahmen der *chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zelltherapie genutzt werden. Ko-Expression eines synthetisch mutierten IL-7R α verstärkt das Wachstum und Überleben der CAR-T-Zellen und erhöht somit die Effektivität der Behandlung solider Tumoren [129]. Konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren bieten somit vielversprechende Ansätze für den Einsatz in der Immun- und Tumorthherapie.

1.7 Ziele der Arbeit

Die Signaltransduktion von IL-23 erfolgt nach Bindung an den Rezeptor u. a. durch Aktivierung des JAK/STAT-Wegs. Wie bei IL-6 initiiert dies die Transkription von SOCS3. In einem negativen Rückkopplungsmechanismus hemmen SOCS Proteine durch Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinen normalerweise Zytokinsignale, die über Klasse I Zytokinrezeptoren vermittelt werden. Anders ist dies im IL-23 Signalweg. Trotz steigender Konzentration von SOCS3 in Ba/F3-Zellen findet keine Hemmung des IL-23 Signals statt. Phosphorylierung und Aktivierung intrazellulärer Signalproteine wie STAT3 sind stattdessen stetig zu beobachten [81, 86]. Ein überaktiver IL-23 Signalweg ist zudem an der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen chimäre Rezeptorvarianten aus Anteilen des humanen IL-23R sowie des humanen gp130 kloniert werden, um damit verbundene Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion in Ba/F3-Zellen untersuchen zu können. Gp130 weist eine bekannte SOCS3 Bindestelle auf und eine Suppression des IL-6 vermittelten STAT3 Signals ist eindeutig nachweisbar [111, 112, 114, 115]. Nach Fusion der ICD des gp130 mit der ECD sowie der TMD des IL-23R ist eine SOCS3 Suppression nach IL-23 Stimulation zu erwarten. Folgende Rezeptorchimäre sollen im Rahmen dieser Arbeit kloniert werden: IL-23R-gp130-642-813; IL-23R-gp130-642-813 Y502F; IL-23R-gp130-WLYEDIPN; IL-23R-SOCS3-gp130-750-764; IL12R β 1 Δ 640-gp130-709-813. Nachfolgend sollen die Rezeptorchimäre in Ba/F3-gp130 Zelllinien stabil etabliert und hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression analysiert werden. Anschließend erfolgt die Charakterisierung der IL-23 abhängigen Zellproliferation sowie der IL-23 vermittelten Signaltransduktion. Der Fokus liegt auf der Untersuchung des JAK/STAT-Wegs und der Analyse der Aktivierung und Hemmung von STAT3 über einen Zeitraum von 5 Stunden nach Stimulation der Zellen. Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, weshalb eine anhaltende STAT3 Aktivität trotz Transkription von SOCS3 zu beobachten ist und welche Motive innerhalb eines Rezeptors zur SOCS Bindung essenziell sind. Darüber hinaus soll eine verminderte STAT3 Aktivierung nach Stimulation mit IL-23 durch SOCS3 induziert und etabliert werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die Synthese einer konstitutiv aktiven IL-23R Variante. Dabei wird die TMD des humanen IL-23R durch die TMD des humanen IL-7R α ersetzt. Die TMD des IL-7R α weist eine Insertion der 4 Aminosäuren „PPCL“ auf, die zu einer ligandenunabhängigen konstitutiven Aktivität des IL-7R α führt [131]. Dies stellt einen gezielten therapeutischen Ansatz in der CAR-T-Zelltherapie dar [129]. Nach Klonierung der

IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL Variante wird der chimäre Rezeptor in Ba/F3-gp130 Zelllinien transduziert und hinsichtlich der Oberflächenexpression überprüft. Auch hier erfolgt anschließend die Analyse der IL-23 abhängigen Zellproliferation und der IL-23 vermittelten Signaltransduktion. Eine konstitutiv aktiv mutierte IL-23R Variante wäre möglicherweise von therapeutischem Nutzen und eine Alternative in der CAR-T-Zelltherapie. Zudem könnte somit eine weitere Methode zur Analyse überaktiver IL-23 Signale und damit verbundener Folgen etabliert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Im Rahmen der Arbeit verwendete Antibiotika sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Antibiotika, Stamm- und Arbeitskonzentration

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	200 µg/ml Festmedien 100 µg/ml Flüssigmedien	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B	100 mg/ml	1 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	10000 U/ml	60 mg/ml	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Puromycin	1 mg/ml	1,5 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	10 mg/ml	100 mg/ml	Genaxxon, Ulm, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Primäre und sekundäre Antikörper (AK), die im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendet wurden, sind in Tabelle 2, im Rahmen von Western Blots in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 2: Übersicht der Antikörper - Durchflusszytometrie

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer	Ursprung
α-IL-12Rβ1-PE	1:10	R&D Systems, Minneapolis, USA	FAB839P	Maus
α-IL-12Rβ2	1:100	BD, Franklin Lakes, USA	550722	Ratte
α-IL-23R biotinyliert	1:40	R&D Systems, Minneapolis, USA	BAF1400	Ziege
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer	Ursprung
α-rat Alexa Fluor®647	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland	112-607-003	Ziege
Streptavidin-APC	1:100	BD, Franklin Lakes, USA	554067	-

Tabelle 3: Übersicht der Antikörper - Western Blot

Primäre Antikörper	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer	Ursprung
α -ERK1/2	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	9102S	Hase
α -FLAG	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F7425	Hase
α -HA	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	3724S	Hase
α -IL-12R β 1	1:300	R&D Systems, Minneapolis, USA	BAF839	Ziege
α -IL-23R	1:1000	R&D Systems, Minneapolis, USA	BAF1400	Ziege
α -myc	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	2278S	Hase
α -pERK1/2	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	4370L	Hase
α -pSTAT3	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	9145L	Hase
α -STAT3	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	4904S	Hase
α -SOCS3 (Testexpression)	1:1500	Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan	C204	Hase
α -SOCS3 (Stimulationen)	1:600	Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan	C005	Hase
Sekundäre Antikörper	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer	Ursprung
α -mouse-POD	1:2500	Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, USA	18-8817-31	Ratte
α -rabbit-POD	1:2500	Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, USA	18-8816-31	Maus
Streptavidin-HRP	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	3999S	-

2.1.3 Chemikalien

Im Rahmen der Arbeit verwendete Chemikalien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Complete EDTA-free</i> Proteaseinhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu, Heidelberg, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%	VWR International, Radnor, USA
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	VWR International, Radnor, USA
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	VWR International, Radnor, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
25 mM Magnesiumchlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP-40	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Bethesda Research Laboratories, New Jersey, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.4 Enzyme

Die in der Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Übersicht der Enzyme und entsprechende Schnittstellen bei Restriktionsenzymen

Enzyme	Restriktionsstelle 5'-3'	Hersteller
BglII	A↓GATCT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BspTI (AflII)	C↓TTAAG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DpnI	GA ^{m6} ↓TC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>DreamTaq</i> DNA Polymerase	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EcoRI	G↓AATTC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eco32I (EcoRV)	GAT↓ATC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eco105I (SnaBI)	TAC↓GTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Esp3I (BsmBI)	CGTCTCN _i ↓	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 5: Übersicht der Enzyme und entsprechende Schnittstellen bei Restriktionsenzymen (Fortsetzung)

Enzyme	Restriktionsstelle 5'-3'	Hersteller
FAST-AP	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HindIII	A↓AGCTT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
KpnI	GGTAC↓C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MssI (PmeI)	GTTT↓AAAC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NcoI	C↓CATGG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NheI	G↓CTAGC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NotI	GC↓GGCCGC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase</i>	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>T4 Polynucleotide Kinase (PNK)</i>	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4 DNA Ligase	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XbaI	T↓CTAGA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XhoI	C↓TCGAG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Geräte

In Tabelle 6 sind die benutzten Geräte und deren Hersteller genannt.

Tabelle 6: Übersicht der Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
BD FACSCanto TM II Durchflusszytometer	BD, Franklin Lakes, USA
Bio-Rad SDS-Gelfuß	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CO ₂ -Inkubator 150 (E2)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Digitalmikroskop Keyence BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Einkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fluorometer Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Primovert	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 6: Übersicht der Geräte und Hersteller (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Gefrierbehälter	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Gelelektrophorese Gießschale	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Hamilton-Pipette	Hamilton, Nevada, USA
Inkubator Titramax 1000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Intas® ECL ChemoCam <i>Imager</i>	Intas, Göttingen, Deutschland
Intas® UV-Transilluminator	Intas, Göttingen, Deutschland
Intelli-Mixer (Rollenmischer)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Deutschland
Kühlzentrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle FD 9404	Siemens Elektrogeräte, München, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Multipette® M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Pegstar PCR Thermocycler</i>	VWR international, Radnor, USA
Pipetus® Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
<i>PowerPac™ Basic</i> Elektrophoresenetzteil	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Präzisionswaage Entris124-1S	Sartorius Lab, Göttingen, Deutschland
Rollenmischer RM5-30V	Cat, Staufen, Deutschland
ScanLaf Sicherheitswerkbank Mars 1200	Labogene ApS, Lyngby, Dänemark
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Trans-Blot® Turbo™ Transfer System</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Tiefkühler -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tiefkühler -20°C	Liebherr, Bulle, Deutschland
Vortexmixer	Neolab, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 6: Übersicht der Geräte und Hersteller (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Waage EMB 2000-2	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Wasserbad AquaLine AL 25	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturabsaugesystem	KNF Labport, Village-Neuf, Frankreich
Zellzähler TC10™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Kits

In Tabelle 7 sind alle in der Arbeit verwendeten Kits aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Kits und Hersteller

Kits	Hersteller
<i>CellTiter-Blue® Cell Viability Essay</i>	Promega, Madison, USA
<i>NucleoBond® Xtra Midi/Maxi</i>	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin® Gel and PCR clean-up</i>	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin® Plasmid -Mini</i>	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
<i>Pierce™ BCA Protein Assay</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>SignalFire™ ECL Reagent</i>	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA
<i>SignalFire™ Elite ECL Reagent</i>	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA

2.1.7 Lösungen und Puffer

Im Rahmen der Arbeit verwendete Lösungen und Puffer sind in Tabelle 8 genannt.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
Blockierlösung	5% Milchpulver in TBS-T
BSA-Lösung	5% BSA in TBS-T
dNTP Mix 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>DreamTaq</i> Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer (Fortsetzung)

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
FAST-AP-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GC-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HD Green	Intas, Göttingen, Deutschland
HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysepuffer Co-IP	1 mM EDTA 150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 1% Triton 1 Tablette Proteaseinhibitor/ ml
Lysepuffer (JAK2)	0,5 mM EDTA 10 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,5% NP-40 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 Tablette Proteaseinhibitor/ 50 ml
OrangeG DNA-Ladepuffer (6x)	50 mM EDTA 30% Glycerin 0,25% OrangeG
PEG4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl (pH 7,4) 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
Restriktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Sammelgelpuffer, pH 6,8	500 mM Tris 0,4% SDS
SDS-PAGE Transferpuffer	10% 10x Puffer 20% Methanol 0,1% SDS
SDS-PAGE Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris 0,4% SDS
5x SDS-Probenpuffer reduzierend (Lämmli)	0,00025 mM Bromphenolblau 10% Glycerin 5% β -Mercaptoethanol

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer (Fortsetzung)

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
	2% SDS 72 mM Tris-HCl pH 6,8
<i>Solution 1</i> (S1)	10 mM EDTA pH 8.0 50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8.0 1:1000 RNase
<i>Solution 2</i> (S2)	0,2 M NaOH 1% SDS
<i>Solution 3</i> (S3)	5 M Kaliumacetat 11,5% Essigsäure (99,9%)
<i>Stripping</i> Puffer	0,1% β -Mercaptoethanol 2% SDS 62,4 mM Tris-HCl pH 6,8
T4-DNA-Ligasepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TBS-T Puffer	1% TBS-Puffer 0,05% Tween 20
Tris-Acetat EDTA Puffer (TAE)	0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure 0,4 M Tris-HCl pH 8,8
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 10x pH 7,5	200 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM g NaCl
TriTrack DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	1:10 Trypsin-EDTA in PBS Genaxxon, Ulm, Deutschland
<i>TurboFect</i> TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.8 Marker

Alle verwendeten Marker sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Marker

Marker	Hersteller
<i>GeneRuler</i> TM 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher, Vilnius, Litauen
<i>GeneRuler</i> TM Express DNA Ladder	Thermo Fisher, Vilnius, Litauen
<i>PageRuler</i> TM Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Vilnius, Litauen

2.1.9 Medien

Für Zelllinien sowie Bakterien eingesetzte Kulturmedien sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Übersicht der Kulturmedien und deren Zusammensetzung

Medien	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) -/-	4,5g/L D-Glucose L-Glutamin Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM+/+	DMEM-/- 10% FCS 1% Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luria-Bertani (LB) Agar	1,5% Agar-Agar 200 µg/ml Ampicillin 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1% Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luria-Bertani Medium	100 µg/ml Ampicillin 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1% Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.10 Oligonukleotide

In Tabelle 11 aufgeführte Oligonukleotide wurden als *primer* zu Klonierungszwecken, für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und Sequenzierungsanalysen verwendet. Alle Produkte stammen von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland.

Tabelle 11: Übersicht der Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz 5'-3'
DF16	pcDNA3.1 fwd	AAATTAATACGACTCACTATAGG
DF38	pCR-Script fwd1	TGCTGCAAGGCGATTAAG
DF39	pCR-Script rev1	ATGCTTCCGGCTCGTATG
DF46	c-myc pR1	CATTCAGATCCTCTTCTGAGATG
DF85	5'pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF86	3'pMOWS	AGCAATAGCATGATACAAAGG
DF155	hIL-23R-Not rev	CTGCGGCCGCCTTTTCCAAGAGTGAAATCC
DF249	gp130-Not-rev	TCTGCGGCCGCCTGAGGCATGTAGCCG
DF352	hIL12Rb1-FP3	GACCCGGATCCGGCTGG

Tabelle 11: Übersicht der Oligonukleotide (Fortsetzung)

Name	Beschreibung	Sequenz 5'-3'
DF366	hIL23R-EcoRV-FP2	CTTCTGGATATCCGCCAGATATTCCTG
DF373	hSD4-FP	ACAGTTGCTTCCATCTCTACAGGGCAC
DF479	hIL-23R-SnaBI-FP	GCCAAACATTAAGTACGTATTTCAAGTGAG
DF504	hIL12Rb1-RT-RP2	TGTCCCAGGACATCTCTACCAC
DF737	mp19-FLAG-L1	GGCCGCAGACTACAAAGATGACGATGATAAAGC
DF738	mp19-FLAG-L2	GGCCGCTTTATCATCGTCATCTTTGTAGTCTGC
DF748	FLAG-FP	CCGCAGACTACAAAGATGACGATGATAAAGCGG
DF796	hIL12Rb1-Esp31-F	CGCACCACGTCTCGGTGAAGAATCATAGC
DF801	SOE-gp130-813-FP	GCCCAGGCAACAGGGATATAAACCCCAAATTTCA
DF802	SOE-gp130-813-RP	GGTTTATATCCCTGTTGCCTGGGCAAAATACCATCAC
DF813	WLYEDIPN-FP	TGGCTTTATGAAGATATTCCTAATAGTGGCTACAGACAC- CAAGTTCCGTC
DF814	WLYEDIPN-RP	ATTAGGAATATCTTCATAAAGCCAAGTGCTCGAAGTGTT- TTGTGAAGATTC
DF815	hIL-23R-hIL7RTM-FP	CTGACAACAGAGGACCCATCCTGCTGCCCCCTT
DF816	hIL-23R-hIL7RTM-RP	CAGGATGGGTCTCTGTTGTCAGAAGTAAGGTGCCCTG
DF819	Y502F_P1	CGGAACTTGGTGTCTGAAGCCACTGTGTACCAC
DF820	Y502F_P2	GTGGTACACAGTGGCTTCAGACACCAAGTTCCG
DF821	SOCS3-C-SOE-FP	AGCACCGCCAGCACAGTTGAGTATTCTACCGTGG- TACACAGCGG
DF822	SOCS3-C-SOE-RP	CTCAACTGTGCTGGCGGTGCTTAGCGAGTTTTGCGGG- TAGTCTC
DF823	gp130-Q813-Not-RP	GACGCGGCCGCTGTTGCCTGGGCAAAATACCATCACC
DF824	12Rb1-gp130-Q813- SOE-FP	GACAGAGCTACCTGAGAAATCATTGGACCTGTTCA- AAAAGG
DF825	12Rb1-gp130-Q813- SOE-RP	GTCCAATGATTTCTCAGGTAGCTCTGTCTT- CTCGAGAGGCTC
DF826	HTG-HSG-P1	TTTGGGGTTTATATCCGCTGTGTACCACGGTAGAATACT- CAAC
DF827	HTG-HSG-P2	GTTGAGTATTCTACCGTGGTACACAGCGGATATAAAC- CCCAA

2.1.11 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Plasmide sind in Tabelle 12 beschrieben.

Tabelle 12: Plasmide, Herkunft und Resistenz

Plasmid	Insert	Antibiotikaresistenz	Quelle
p409	IL-12R β 1 QMG	Ampicillin	[134]
	IL-12R β 1-2A-hIL-23R	Ampicillin	Doreen M. Floss
	IL-23R	Ampicillin	[134]
	IL-23R-gp130-642-765	Ampicillin	[135]
	SOCS3 Δ PEST-HA-myc	Ampicillin	[136]
pCR-Script	IL-23R-gp130		[135]
pMOWS-hygro	GFP	Hygromycin B	[137]
	IL-12R β 1	Hygromycin B	[134]
pMOWS-puro	GFP	Puromycin	[137]
	IL-23R-W395V	Puromycin	Doreen M. Floss
	IL-23R-VV	Puromycin	Doreen M. Floss
	IL-23R-VVV	Puromycin	Doreen M. Floss
	IL-23R-gp130	Puromycin	[135]
	IL-23R-gp130-642-765	Puromycin	[135]
	IL-23R-SOCS-A	Puromycin	Doreen M. Floss
	IL-23R-SOCS-B	Puromycin	[136]
pcDNA	IL-12R β 2-Q426H	Puromycin	Doreen M. Floss
	GFP-VHH-IL-7R-ECD-TMD(PPCL)-IL-23R-ICD	Ampicillin	[138]

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 13 sind die Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Alu-Laborfolie	k. A.
<i>Combitips advanced</i> ® 0,5 - 50 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Tubes	Corning Inc., Corning, USA
Falcon 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitril-Handschuhe	WRP, Sepang, Malaysia
Pasteur-Pipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß Multiply® 0,2 ml und -kappen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischale 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF Transfermembran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>SafeSeal</i> Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>SafeSeal</i> Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette (Stripette) 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette (Stripette) 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette (Stripette) 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturflaschen 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturschale 10 cm (adhärent)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturschale 15 cm (adhärent)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturschale 10 cm (suspension)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturschale 15 cm (suspension)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturplatten, 6-well, CytoOne®	Starlab International, Hamburg, Deutschland
Sterile Zellkulturplatten, 12-well, CytoOne®	Starlab International, Hamburg, Deutschland
Sterile Zellkulturplatten, 96-well, CytoOne®	Starlab International, Hamburg, Deutschland

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Zellkulturplatten, 96-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Whatman® Filterpapier	VWR, Randor, USA
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellzählkammern	BioRad Laboratories, Hercules, USA

2.1.13 Zelllinien

Zelllinien, die für diverse Experiment mit Zellkulturen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 14 gelistet. Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 lac glnV44 F' [:TN10 pro AB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) genutzt.

Tabelle 14: Zelllinien, Ursprung und Herkunft

Zelllinie	Ursprung	Charakteristika	Quelle
Ba/F3-gp130	Murine Prä-B-Zelllinie	Suspensionszellen, IL-6 abhängig	Immunex, Seattle, USA
Ba/F3-gp130-IL-23R	Murine Prä-B-Zelllinie	Suspensionszellen, IL-6 abhängig	[134]
Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1	Murine Prä-B-Zelllinie	Suspensionszellen, IL-6 abhängig	[74]
Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R	Murine Prä-B-Zelllinie	Suspensionszellen, IL-23 abhängig	[139]
Ba/F3-gp130-IL-12Rβ2	Murine Prä-B-Zelllinie	Suspensionszellen, IL-6 abhängig	Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Düsseldorf, Deutschland
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland, (ACC 305)
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland (ACC 635)
Phoenix-Eco	Humane embryonale Nierenzellen	Adhärente Zellen	DKFZ, Heidelberg, Deutschland
U4C	Humane Fibrosarkomzellen	Adhärente Zellen	[140]

2.1.14 Zytokine

Für die Stimulation von Zellkulturen eingesetzte Zytokine sind in Tabelle 15 genannt. Hyper-IL-6 (HIL-6) ist ein Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, das zur Stimulation gp130 exprimierender Zellen verwendet wird [141]. Hyper-IL-23 (HIL-23) wird zur Stimulation IL-23 exprimierender Zellen verwendet und besteht aus den murinen Untereinheiten p40 und p19, die über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind [43].

Tabelle 15: Übersicht der eingesetzten Zytokine, Konzentration und Ursprung

Zytokine	Stammkonzentration
HIL-6	konditionierter Zellkulturüberstand 10 mg/ml
HIL-6	0,676 mg/ml
HIL-23	0,68 mg/ml

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

Mittels Hitzeschocktransformation wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* eingebracht und anschließend vervielfältigt. Dafür wurden Aliquots von *E. coli* (30 µl) bei -80°C gelagert und vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl der Plasmid-DNA, respektive 10 µl Ligationsansatz, zugegeben und das Gemisch 5 min auf Eis inkubiert. Die Hitzeschocktransformation erfolgte durch Inkubation des Ansatzes für 1 min bei 42°C, woraufhin eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis folgte. 500 µl erwärmtes LB-Medium wurde hinzugegeben, bevor die transformierten Zellen unter Schütteln (800 rpm) bei 37°C inkubiert wurden. Nach 1 h wurden 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Reinigung der DNA aus transformierten *E. coli* stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden unter anderem die Mini-Präparation mit und ohne Kit sowie die Midi-Präparation mit Kit angewendet. Dabei wurde die Mini-Präparation insbesondere nach Transformation von Ligationsansätzen zur Selektion positiver *E. coli* Kulturen genutzt. Die Midi-Präparation diente vor allem der Aufreinigung großer Mengen an DNA.

Plasmid Mini-Präparation ohne Kit

Mithilfe einer Mini-Präparation wurde Plasmid-DNA aus vermeintlich positiven *E. coli* Kolonien isoliert. Dafür wurde über Nacht eine *E. coli* Kolonie in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum bei 37°C unter ständigem Schütteln (850 rpm) inkubiert und 1,5 ml des Ansatzes anschließend für 5 min und 1300 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die restlichen 500 µl des Ansatzes wurden bei 4°C gelagert, um im Falle von positiven Kolonien weiterführend eine Midi-Präparation durchführen zu können. Das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 100 µl kalter S1-Lösung resuspendiert und durch Zusatz von 200 µl der S2-Lösung lysiert. Nach maximal 5 min wurde 150 µl kalte S3-Lösung zur Neutralisation zugegeben. Das Gemisch wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA und Zelltrümmer voneinander zu trennen. Die DNA, die sich nach der Zentrifugation im Überstand befindet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl 100% Ethanol versetzt. Nach Inkubation auf Eis für 5 min erfolgte erneut eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 rpm sowie Entfernung des Überstands. Das übrig gebliebene DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 30 µl H₂O_{dd} gelöst. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsspaltung analysiert (siehe 2.2.5). Zur Gewinnung größerer Mengen DNA wurde weiterführend eine Midi-Präparation durchgeführt.

Plasmid Mini-Präparation mit Kit

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus vermeintlich positiven *E. coli* Kolonien, die anschließend sequenziert werden sollten, wurde eine Mini-Präparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit durchgeführt. Wie bei der Mini-Präparation ohne Kit wurde auch hier über Nacht ein *E. coli* Klon in 2 ml LB-Medium und entsprechendem Selektionsantibiotikum bei 37°C unter ständigem Schütteln (850 rpm) inkubiert und 1,5 ml Ansatzes anschließend zentrifugiert (11000 rpm, 30 s, RT). Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben, wobei anstatt AE-Puffer 50 µl H₂O_{dd} zur Elution der DNA verwendet wurde. Mittels Restriktionsspaltung wurde die gewonnene DNA analysiert (siehe 2.2.5) und die Konzentration am NanoDrop® bestimmt (siehe 2.2.3). Zur weiteren Überprüfung der DNA-Sequenz wurde die Plasmid-DNA außerdem sequenziert (siehe 2.2.4).

Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Am Tag vor der Präparation wurden transformierte *E. coli* in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml LB-Medium und entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 4000 rpm wurde die Plasmid-DNA mithilfe des NucleoBond® Xtra Midi/Maxi von Machery-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Nach Präzipitation der Plasmid-DNA wurde diese mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 100 µl H₂O_{dd} gelöst. Mittels Restriktionsspaltung (siehe 2.2.5) und Sequenzierung (siehe 2.2.4) wurde die gewonnene Plasmid-DNA analysiert, sowie die Konzentration am NanoDrop® durch UV-Spektroskopie bestimmt (siehe 2.2.3).

2.2.3 Konzentrationsmessung DNA

Durch Messung der DNA-Absorption bei 260 nm mittels UV-Spektroskopie am NanoDrop® wurde die Konzentration der gewonnenen DNA bestimmt.

2.2.4 Sequenzierung

Die Prüfung einer DNA-Sequenz auf Korrektheit wurde mittels Sequenzierung im *Microsynth Seqlab* Göttingen durchgeführt. *Primer*, die nicht auf der Standardliste der Firma vorhanden sind, wurden zusätzlich der Firma übersandt und sind in Tabelle 11 aufgelistet.

2.2.5 Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Plasmid-DNA aus Mini- und Midi-Präparationen mittels Restriktionsspaltung und zur Linearisierung der DNA im Rahmen der Klonierung wurden Restriktionsenzyme eingesetzt. Mithilfe des Programms *SnapGene* konnten vor der Analyse die Schnittstellen der jeweiligen Enzyme an der entsprechenden DNA herausgefunden werden. Für die Restriktionsspaltung wurden 1 µg (Kontrolle) bzw. 10 µg (Linearisierung) Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen versetzt und mit zugehörigem Puffer (10x), sowie H₂O_{dd} zu einem Gesamtvolumen von 20 µl bzw. 40 µl aufgefüllt. Nach Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 37°C wurde die Aktivität der Enzyme mittels Zugabe von OrangeG DNA-Ladepuffer (6x) oder durch Inkubation des Ansatzes für 20 min bei 65°C beendet. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese voneinander in der Größe getrennt und unter UV-Licht analysiert (siehe 2.2.6). Sofern die DNA-Fragmente zur Klonierung weiterverwendet werden sollten, wurde eine Gelextraktion zur Isolierung und Reinigung der gewünschten DNA-Fragmente durchgeführt (siehe 2.2.7).

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Größentrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde zunächst 1-2% Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst. Zum Sichtbarmachen der DNA-Fragmente wurde dem Agarosegel HD Green zugesetzt. Nach Beladung der Gele mit den zu analysierenden DNA-Fragmenten und DNA-Markern zur Größenzuordnung wurde eine Spannung zur Trennung der DNA-Fragmente angelegt. Mithilfe des Intas® UV-Transilluminator wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

2.2.7 Gelextraktion

Die Gelextraktion von DNA-Fragmenten erfolgte nach Größentrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.6). Dafür wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mithilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Anschließend erfolgte eine Kontrolle der gereinigten DNA mittels erneuter Agarosegelelektrophorese. Das Kit wurde außerdem zur Reinigung von PCR- und Restriktionsspaltungsprodukten verwendet.

2.2.8 Phosphorylierung von DNA

Sofern ein mittels PCR generiertes DNA-Fragment als *insert* für eine Ligation (siehe 2.2.10) verwendet werden sollte, musste das *insert* zunächst am 5'-Ende phosphoryliert werden. Dafür wurden 132 µl PCR-Produkt, 2 µl PNK und 15 µl T4-DNA-Ligasepuffer vermischt, bei 37°C für 30 min inkubiert und das Enzym anschließend für 5 min bei 72°C deaktiviert. Mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.6) und Gelextraktion (siehe 2.2.7) wurde der Ansatz gereinigt.

2.2.9 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation mussten entsprechende Vektoren dephosphoryliert werden. Dazu wurden 40 µl des durch Restriktionsspaltung linearisierten Vektors mit 2 µl FAST-AP, 1 µl FAST-AP-Puffer und 7 µl H₂O_{dd} gemischt, für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.6) und Gelextraktion (siehe 2.2.7) gereinigt.

2.2.10 Ligation

In weiteren Klonierungsschritten wurden *insert* und Vektor durch Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende miteinander verbunden. Dies erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die Ligation von Vektor und *insert* erfolgte in einem Konzentrations-Verhältnis von 1:5. Dem Gesamtansatzvolumen von

20 µl wurden 2 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 2 µl PEG4000 sowie H₂O_{dd} zugesetzt und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen, Analyse von Klonen sowie zur Generierung neuer IL-23- und IL-12Rβ1-Rezeptorvarianten genutzt.

PCR zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten

Zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte wurde zunächst ein PCR-Ansatz (Tabelle 16) mit einem Gesamtvolumen von 50 µl hergestellt. Das entsprechend durchgeführte PCR-Programm am *Thermocycler* ist in Tabelle 17 aufgelistet. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt (siehe 2.2.6) und die gewünschten Abschnitte aus dem Gel extrahiert und gereinigt (siehe 2.2.7).

Tabelle 16: PCR-Ansatz zur DNA-Vervielfältigung

Zugabe	Menge
<i>template</i> DNA 1:100	1 µl
HF-/ GC-Puffer	10 µl
<i>forward/ reverse primer</i> 1:10	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>phusion polymerase</i>	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	32,5 µl

Tabelle 17: PCR-Programm zur DNA-Vervielfältigung

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	10 s	30x Zyklen
<i>Annealing</i>	60°C	15 s	
Elongation	72°C	20-25 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Splicing by overlap extension (SOE)-PCR

Zur Generierung neuer Rezeptorvarianten wurden zwei DNA-Fragmente nach einer Amplifikations-PCR in einer weiteren PCR miteinander fusioniert (Abb. 6). Dazu wurde ein PCR-Ansatz (Tabelle 18) mit gereinigten DNA-Fragmenten und einem Gesamtvolumen von 50 µl hergestellt. Das PCR-Programm zur Fusion der beiden DNA-Fragmente ist in Tabelle 19

aufgelistet. Zur Kontrolle der Fusion wurde nach der PCR eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.2.6).

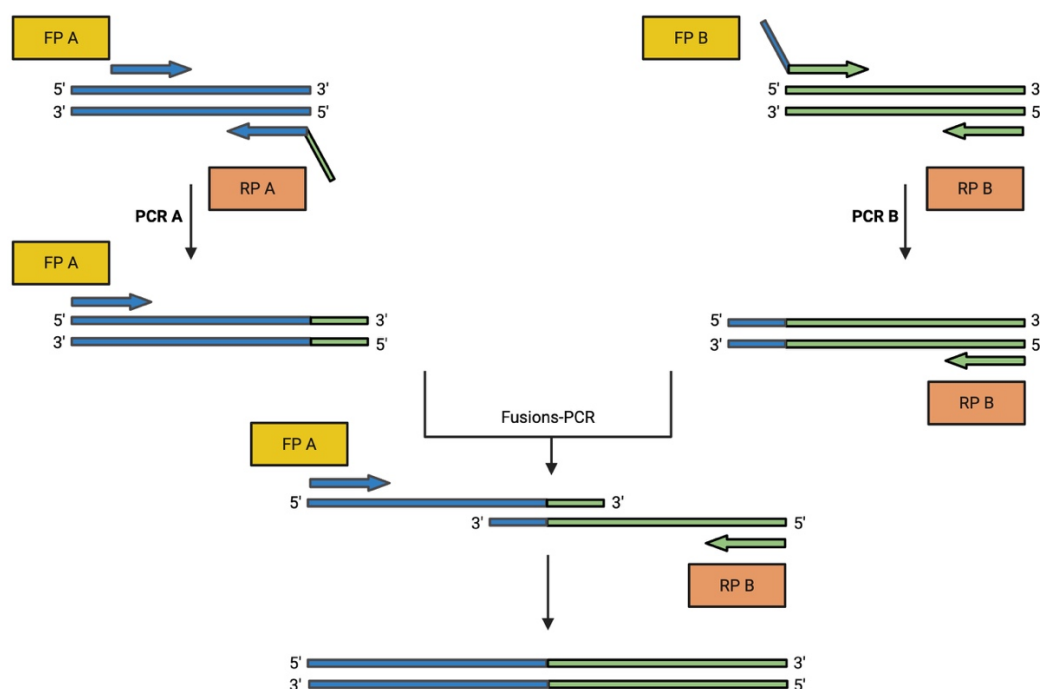


Abb. 6: Schematische Übersicht SOE-PCR. In zwei separaten PCRs (A und B) werden durch Zugabe eines *forward primer* (FP) und eines *reverse primer* (RP) DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen generiert. In einer nachfolgenden Fusions-PCR werden beide DNA-Fragmente miteinander fusioniert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com nach [142].

Tabelle 18: Ansatz Fusions-PCR

Zugabe	Menge
je DNA- <i>template</i>	1 µl
HF-/ GC-Puffer	10 µl
<i>forward/ reverse primer</i> 1:10	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>Phusion polymerase</i>	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	31,5 µl

Tabelle 19: PCR-Programm zur Fusions-PCR

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	10 s	30x Zyklen
<i>Annealing</i>	60°C	15 s	
Elongation	72°C	30-35 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Colony-PCR zur Analyse von Klonen

Zur Identifikation positiver Klone nach Ligation von Vektor und *insert* (siehe 2.2.10) und Transformation des resultierenden Plasmids in *E. coli* (siehe 2.2.1) wurde eine *colony*-PCR durchgeführt. Dazu wurden zunächst einzelne Kolonien der LB-Agarplatten mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl H₂O_{dd} überführt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl eines Master-Mix Ansatzes (Tabelle 20) zugegeben und die PCR (Tabelle 21) durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurde der Ansatz mit 10 µl OrangeG Ladepuffer versetzt und die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.6). Die Pipettenspitze wurde außerdem zur darauffolgenden Mini-Präparation in ein Reaktionsgefäß mit 2 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C über Nacht und schüttelnd inkubiert.

Tabelle 20: Mastermix-Ansatz *colony*-PCR

Zugabe	Menge
<i>Dream Taq</i> Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
<i>forward/ reverse primer</i> (100 pmol/ µl)	0,25 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>Dream Taq</i> (5 U/ µl)	0,2 µl
H ₂ O _{dd}	19,3 µl

Tabelle 21: *Colony*-PCR Programm

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	30x Zyklen
<i>Annealing</i>	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min pro kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Site-directed mutagenesis (SDM)-PCR

Die Mutation einzelner Aminosäuren in einer DNA-Sequenz erfolgte mittels *site-directed mutagenesis* (SDM)-PCR [143]. Dafür wurden zunächst zwei PCR-Ansätze A und B mit dem gleichen DNA-*template*, aber unterschiedlichen *primern*, hergestellt (Tabelle 22). Die *primer* enthielten die entsprechende Mutation. Nach der Durchführung des PCR-Programms (Tabelle 23) wurden beide PCR-Ansätze miteinander vermischt, 1 µl *Phusion polymerase* je 50 µl Reaktionsansatz zugegeben und das PCR-Programm erneut durchgeführt.

Anschließend wurde der Ansatz mithilfe des PCR *clean-up* Kits gereinigt, durch Restriktionsspaltung geschnitten (siehe 2.2.5) und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (siehe 2.2.1). Nach einer Mini-Präparation mit Kit (siehe 2.2.2) wurde die erfolgreiche Mutation mittels Sequenzierung überprüft (siehe 2.2.4).

Tabelle 22: Ansatz für *site-directed mutagenesis*, Ansatz A wurde mit dem *forward primer*, Ansatz B mit dem *reverse primer* versetzt

Zugabe	Menge
DNA-template	1 µl
HF-Puffer	10 µl
<i>forward/ reverse primer</i> (100 pmol/ µl)	0,4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>Phusion polymerase</i>	1 µl
H ₂ O _{dd}	36,6 µl

Tabelle 23: PCR-Programm *site-directed mutagenesis*

Programmpunkt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98°C	4 min	
Denaturierung	98°C	1 min	15x Zyklen
<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
Elongation	72°C	15-30 s pro kb	
Finale Elongation	72°C	12 min	

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen wurden in 10 ml DMEM^{+/+} kultiviert und alle drei Tage passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und stark adhärenente Zellen mit erwärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Mithilfe von PBS (schwach adhärenente Zellen) oder Trypsin-EDTA (stark adhärenente Zellen) wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß mit Medium überführt und die Zelldichte nach Zugabe von Trypanblau mittels Zellzähler gemessen. Anhand der bestimmten Konzentration wurde die gewünschte Menge an Zellen in eine neue Schale mit DMEM^{+/+} transferiert.

2.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Ba/F3-Suspensionszellen wurden in 10 ml DMEM^{+/+} mit entsprechendem Zytokin und Selektionsantibiotikum kultiviert. Alle sieben Tage erfolgte das Passagieren, wobei 0,25 µl der Ba/F3-gp130 bzw. 0,5 µl der Ba/F3-Zellen in eine frische Schale mit 10 ml DMEM^{+/+},

Zytokin und Selektionsantibiotikum transferiert wurden. Für Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit Ba/F3-gp130 Zellen in zusätzliche Zellkulturschalen oder -flaschen überführt.

2.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Mithilfe von *TurboFectTM* wurden DNAs für Rezeptorvarianten des IL-23R und IL-12R β 1 in Zellen eingebracht (genutzte Zelllinien siehe Tabelle 14). Am Tag vor der eigentlichen Transfektion wurden die Zellen gezählt, in Zellkulturschalen ausgesät (Tabelle 24) und über Nacht bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion in 6-well Platten wurden 1 µg DNA und 2 µl *TurboFectTM* in 200 µl DMEM^{-/-} bzw. für 10 cm Schalen 5 µg DNA und 10 µl *TurboFectTM* in 1 ml DMEM^{-/-} angesetzt und für 15-20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Platten vorsichtig geschwenkt, um eine optimale Verteilung zu ermöglichen. Die Inkubation der transfizierten Zellen erfolgte bei 37°C im CO₂-Brutschrank. Bei Transfektion stark adhärenter Zellen wie HEK293 und U4C, sowie Phönix-Zellen wurde nach 6 h ein Mediumswechsel mit DMEM^{+/+} durchgeführt, im Falle der Phönix-Zellen mit einem Gehalt von 30% FCS. 48 h später wurden die Zellen geerntet und analysiert. Bei Verwendung der Phönix-Zellen als Verpackungszelllinie wurde nach 24 h eine retrovirale Transduktion vorgenommen (siehe 2.3.4).

Tabelle 24: Zelllinien und Menge der ausgesäten Zellen zur Transfektion

Zelllinie	6-well Platten	10 cm Schale
HEK293/ HEK293T	4x10 ⁵ Zellen	2x10 ⁶ Zellen
Phönix	6x10 ⁵ Zellen	-
U4C	-	2x10 ⁶ Zellen

2.3.4 Generierung stabiler Zelllinien durch retrovirale Transduktion

Zur Generierung stabiler Ba/F3-Zelllinien mit stetiger Oberflächenexpression verschiedener Rezeptorvarianten des IL-23R und IL-12R β 1 wurde eine retrovirale Transduktion durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Transfektion der pMOWS-Plasmide in Phönix-ECO-Zellen, deren Überstand nach 24 h Inkubation zur retroviralen Transduktion genutzt wurde. Die Ba/F3-Zellen wurden hierfür mit PBS gewaschen und anschließend mittels Zugabe von Trypanblau und Zellzähler gezählt. 1x10⁵ Ba/F3-Zellen wurden gemeinsam mit dem Phönix-Zellüberstand in ein Reaktionsgefäß überführt und 8 µg/ml Polybrene zugegeben. Für 2 h wurde das Gemisch bei RT und 1800 rpm zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand

entfernt. Das Zellpellet wurde in 5 ml DMEM^{+/+} resuspendiert und in 6-well Platten mit dem jeweiligen Zytokin ausgesät. Nach 48 h Inkubation im CO₂-Brutschrank wurden die Zellen mit entsprechendem Antibiotikum selektiert. Für mindestens zwei Wochen wurden die Zellen in 6-well Platten inkubiert, bevor diese dann in 10 cm Schalen überführt wurden.

2.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 2 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension wurde anschließend in Kryoröhrchen überführt und in einer Kryobox über Nacht bei -80°C gelagert. Zur dauerhaften Aufbewahrung der eingefrorenen Zellen wurden diese in Flüssigstickstoff umgelagert.

2.3.6 Proliferationsassay mit Ba/F3-Zellen

Mittels *CellTiter-Blue*[®] und fluorometrischer Messung wurde die Zellproliferation von Ba/F3-Zellen analysiert. Zur Vorbereitung der Messung wurden die Zellen 5 min bei RT und 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, bevor die Zellen auf eine Konzentration von 5x10⁴ Zellen/ml in DMEM^{+/+} verdünnt wurden. Jeweils 5x10³ Zellen wurden mit der entsprechenden Menge an Zytokin oder ohne Zugabe von Zytokin in eine 96-well Platte überführt und für 72 h inkubiert. Anschließend wurde 20 µl *CellTiter-Blue*[®] Lösung in jedes well gegeben. In einem Abstand von 20 min wurde dann für 2 h die Absorption im Photometer gemessen. Sofern metabolisch aktive Zellen in der Lösung vorhanden sind, wird das in *CellTiter-Blue*[®] enthaltene Resazurin zu Resorufin reduziert. Resorufin erzeugt eine Fluoreszenz, die im Photometer erfasst und gemessen werden kann.

2.3.7 Stimulationsassay mit stabilen Zelllinien

Zur Analyse der intrazellulären Signalwege wurden Ba/F3-Zellen in Zellkulturflaschen mit 50 ml DMEM^{+/+} kultiviert und am Tag der Stimulation in 50 ml Falcons überführt. Dreimal wurden die Zellen für 5 min bei RT und 1500 rpm zentrifugiert und mit PBS gewaschen, bevor die Zellen in DMEM^{-/-} resuspendiert und jeweils 1 ml in eine 12-well Platte transferiert wurden. Nach dem *starven* der Zellen für 4 h wurde das entsprechende Zytokin zugegeben und die Zellen weitere 30 min inkubiert sowie geerntet. Für die Beobachtung der Signalkaskade im zeitlichen Verlauf wurden die Zellen nach *starving* mit dem entsprechenden Zytokin über einen Zeitraum von 5 h inkubiert und zum Zeitpunkt 0 – 30 min – 60 min – 120 min – 180 min – 240 min – 300 min geerntet. Die geernteten Zellen wurden für 5 min bei

RT und 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur Herstellung der Zelllysate (siehe 2.4.3) erfolgte bei -80°C.

2.3.8 Stimulationsassay mit transienten Zelllinien

Um die intrazellulären Signalwege in transient transfizierten Zellen zu analysieren, wurde zunächst eine Transfektion von adhären Zellen mit dem entsprechenden Expressionsvektor durchgeführt. Nach einer Inkubation für 24 h in DMEM^{+/+} wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und DMEM^{-/-} zugegeben. Die Stimulation für 30 min mit dem entsprechenden Zytokin erfolgte nach einem *starving* der Zellen für ca. 16 h. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt (siehe 2.4.1, 2.4.2).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten stark adhären Zellen

Nach erfolgter Transfektion und Inkubation für 48 h wurden HEK293-Zellen zur Analyse zellulärer Proteine lysiert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Durch erneute Zugabe von 1 ml PBS und unter Anwendung eines Zellschabers wurden die Zellen geerntet und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm und 4°C, um Zellpellet und Überstand voneinander zu trennen. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 200 µl JAK2-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1,5 h bei 4°C unter ständiger Bewegung und Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Überstand wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt (siehe 2.4.4).

2.4.2 Herstellung von Zelllysaten schwach adhären Zellen

Transfizierte HEK293T- und U4C-Zellen wurden nach 48 h Inkubation zur Analyse zellulärer Proteine lysiert. Dafür wurde der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS von der Platte gespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm und 4°C in 1 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei gleichen Bedingungen und Resuspension des Zellpellets in 200 µl JAK2-Lysepuffer. Nach einer Inkubation von 1,5 h bei 4°C unter ständiger Bewegung und einer folgenden Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt (siehe 2.4.4).

2.4.3 Herstellung Zelllysate stabiler Ba/F3-Zelllinien

Die in Flüssigstickstoff eingefrorenen und bei -80°C gelagerten Pellets von Ba/F3-Zelllinien wurden in 200 μl JAK2-Lysepuffer resuspendiert und für 1,5 h bei 4°C unter konstanter Bewegung inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt (siehe 2.4.4).

2.4.4 Pierce BCA Protein Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde der *BCA Protein Assay* mittels Kit durchgeführt. Hierbei wurden BSA Standards mit bekannten Absorptionsspektren als Vergleich genutzt. Die Lysate und der verwendete JAK2-Lysepuffer wurden 1:20 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und die Messung der Absorption erfolgte mittels Tecan Plattenleser bei 562 nm Wellenlänge. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Lysate anhand der BSA-Standardwerte mittels linearer Regression berechnet.

2.4.5 Western Blot

Die Größentrennung von Proteinen in Zelllysaten erfolgte mittels Gelelektrophorese. Die Lysate wurden dafür mit 5x Lämmli Puffer vermischt, 10 min bei 95°C gekocht und denaturiert. Anschließend wurden die Proben in 10-15% SDS-Polyacrylamidgele gegeben und eine elektrische Spannung angelegt. Dadurch erfolgte eine Trennung der Proteine anhand ihres molekularen Gewichts. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde zudem ein Proteinmarker mit standardisierten Größen aufgetragen [144]. In einem anschließendem *semi-dry* Western Blot Verfahren wurden die voneinander getrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst 2 min in Methanol aktiviert, sowie das *Whatman*-Papier in Transfer-Puffer eingelegt, bevor der Transfer bei 1 A und 20 V für 60 min durchgeführt wurde. Zur Blockade unspezifischer Bindestellen wurde die Membran nach Transfer für 2 h bei RT und ständiger Bewegung in Milch inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und der primäre Antikörper (siehe Tabelle 3) zugegeben. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C . Die Membran wurde dann erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für mindestens 2 h (max. 1 h bei Streptavidin-HRP) inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal gewaschen, beim dritten Mal jedoch nur mit TBS. Die an spezifischen Proteinen gebundenen Antikörper konnten dann mittels *ECL Prime Western-Blot-Detection Reagent* und Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

2.4.6 Entfernung eines Antikörpers von Membranen

Zur Detektion eines weiteren Proteins wurden die primären und sekundären Antikörper auf bereits entwickelten Membranen mittels *stripping* Puffer entfernt. Dafür wurde die Membran für 30 min bei 60°C in *stripping* Puffer inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T gewaschen. Erneut erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindestellen durch eine Inkubation der Membran für 2 h in Milch und anschließender dreimaliger Waschung mit TBS-T, bevor die neuen primären Antikörper zugegeben wurden.

2.4.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell sorting* FACS) wurde zur Analyse der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zelllinien angewandt. Dabei wurden Antikörper verwendet, die gegen den jeweiligen Rezeptor gerichtet sind. Die mit Antikörper markierten Zellen wurden durch das Durchflusszytometer geschleust, wobei Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zur Detektion von Größe und Granularität der Zellen, sowie die spezifischen Fluoreszenzsignale der Antikörper gemessen wurden.

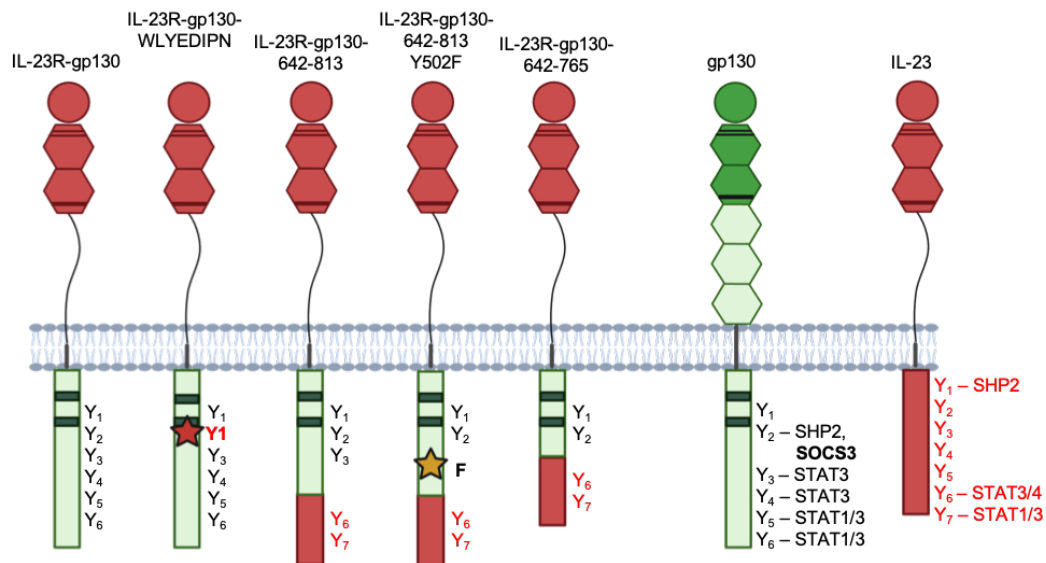
Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden 5×10^5 Zellen zunächst für 5 min bei RT und 2000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in 50 µl FACS-Puffer mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 2) gelöst und für 1-2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben und das Gemisch für 5 min bei RT und 2000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 50 µl FACS-Puffer gemeinsam mit dem sekundären Antikörper resuspendiert, für 1-2 h bei RT inkubiert und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Das endgültige Zellpellet wurde in 500 µl FACS-Puffer gelöst und im Durchflusszytometer analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Chimäre IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Sequenzmotive zur SOCS3 Interaktion identifiziert und eine messbare SOCS3 Suppression des IL-23 Signalwegs induziert werden. Dies erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden fünf Rezeptorchimären IL-23R-gp130, IL-23R-gp130-WLYEDIPN, IL-23R-gp130-642-813, IL-23R-gp130-642-813 Y502F und IL-23R-gp130-642-765 aus Anteilen des humanen IL-23R und des humanen gp130 kloniert (Abb. 7). Es ist bekannt, dass SOCS3 mit Y759 bzw. der Sequenz „VQY⁷⁵⁹STVVH“ des gp130 interagiert [111, 112]. Die Fusion der ECD und TMD des IL-23R und der ICD des gp130 sollte somit eine Hemmung von STAT3 durch SOCS3 nach IL-23 Stimulation ermöglichen. Aus diesem Grund wurde in der ersten Rezeptorvariante IL-23R-gp130 die komplette ICD des gp130 verwendet. Um zu untersuchen, ob das Sequenzmotiv „VQY⁷⁵⁹STVVH“ des gp130 tatsächlich essenziell für die SOCS3 Suppression ist, wurde das Motiv in einer weiteren Rezeptorvariante durch „WLYEDIPN“ ersetzt. „WLYEDIPN“ findet sich im IL-23R um Y397. Dieses Tyrosin interagiert ebenso wie Y759 des gp130 mit SHP2. Aufgrund der Similarität wurde dieses Motiv gewählt.

In den weiteren Rezeptorvarianten IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-642-765 wurde die ICD des gp130 systematisch verkürzt. Somit wurde der Bereich der SOCS3 Interaktionsstelle eingegrenzt und eine Annäherung an den ursprünglichen IL-23R erreicht. Alle Rezeptorvarianten wurden sukzessive in verschiedene Vektoren kloniert, überprüft und anschließend mittels pMOWS-Vektoren retroviral in Ba/F3-gp130 Zelllinien mit IL-12R β 1 eingebaut. Nach Generierung der stabilen Zelllinien wurden Stimulations- und Proliferationsanalysen durchgeführt. Zwei Rezeptorvarianten lagen in unterschiedlichen Vektoren bereits in der AG Scheller vor. Hierbei handelte es sich um pCR-Script bzw. pMOWS-puro-IL-23R-gp130 sowie p409- bzw. pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-765 hergestellt von Felix Thives-Kurenbach im Rahmen seiner Dissertation [135].

A**B**

IL-23R WT	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK WLYEDIPN MKNSNVVKMLQENSELMNNSSEQVL Y V	430
IL-23R-gp130 (642-918)	... SLIGIF NKRDLIKHHIWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNNSKDM Y SDGNFTDVS V VE	430
IL-23R-gp130 (642-918)-WLYEDIPN	... SLIGIF NKRDLIKHHIWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNNSKDM Y SDGNFTDVS V VE	430
IL-23R-gp130-642-813	... SLIGIF NKRDLIKHHIWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNNSKDM Y SDGNFTDVS V VE	430
IL-23R-gp130-642-813 Y502F	... SLIGIF NKRDLIKHHIWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNNSKDM Y SDGNFTDVS V VE	430
IL-23R-gp130-642-765	... SLIGIF NKRDLIKHHIWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNNSKDM Y SDGNFTDVS V VE	430
IL-23R WT	DPMITEIKEIFIPKHKPT Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTTV V IPDLNT Y KPQISN	490
IL-23R-gp130 (642-918)	IEANDKKPFEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSS	490
IL-23R-gp130 (642-918)-WLYEDIPN	IEANDKKPFEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSS	490
IL-23R-gp130-642-813	IEANDKKPFEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSS	490
IL-23R-gp130-642-813 Y502F	IEANDKKPFEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSS	490
IL-23R-gp130-642-765	IEANDKKPFEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSS	490
IL-23R WT	FLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDGNNPRLQKHPNFAFVSVNSLSNTIFLGELS	550
IL-23R-gp130 (642-918)	TVQ Y STVVHSG Y RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVHDVGGDGILPRQ Y F	550
IL-23R-gp130 (642-918)-WLYEDIPN	TVQ WLYEDIPN SG Y RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVHDVGGDGILPRQ Y F	550
IL-23R-gp130-642-813	TVQ Y STVVHSG Y RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVHDVGGDGILPRQ Y F	550
IL-23R-gp130-642-813 Y502F	TVQ Y STVVHSG Y RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVHDVGGDGILPRQ Y F	550
IL-23R-gp130-642-765	TVQ Y STVVHSG Y KPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDGNNPRLQKHPNFAF	550
IL-23R WT	LILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTLTPDEFVSCLGIVNEELPSINT	610
IL-23R-gp130 (642-918)	KQNCQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQISDHISSQSCGSGQMKGQEVSAAD	610
IL-23R-gp130 (642-918)-WLYEDIPN	KQNCQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQISDHISSQSCGSGQMKGQEVSAAD	610
IL-23R-gp130-642-813	KPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDGNNPRLQKHPNFAFVSVNSLSNTI	610
IL-23R-gp130-642-813 Y502F	KPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDGNNPRLQKHPNFAFVSVNSLSNTI	610
IL-23R-gp130-642-765	SVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTLTPD	610
IL-23R WT	Y FPQNILESHFNRIISLEK-----	629
IL-23R-gp130 (642-918)	AFGPGTEGGQVERFETVGMEEATDEGMPKS Y LPQTVRQGG Y MPQ-----	653
IL-23R-gp130 (642-918)-WLYEDIPN	AFGPGTEGGQVERFETVGMEEATDEGMPKS Y LPQTVRQGG Y MPQ-----	653
IL-23R-gp130-642-813	FLGELSLILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTLTPDEFVSCLGIVNEE	670
IL-23R-gp130-642-813 Y502F	FLGELSLILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTLTPDEFVSCLGIVNEE	670
IL-23R-gp130-642-765	EFVSCLGIVNEELPSINT Y FPQNILESHFNRIISLEK-----	647
IL-23R WT	-----	
IL-23R-gp130 (642-918)	-----	
IL-23R-gp130 (642-918)-WLYEDIPN	LPSINT Y FPQNILESHFNRIISLEK-----	695
IL-23R-gp130-642-813	LPSINT Y FPQNILESHFNRIISLEK-----	695
IL-23R-gp130-642-813 Y502F	LPSINT Y FPQNILESHFNRIISLEK-----	695
IL-23R-gp130-642-765	-----	

Abb. 7: Schematische Darstellung der chimären IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten. (A) Übersicht der fünf Rezeptorchimäre sowie gp130 und IL-23R. Tyrosine (Y) sind gekennzeichnet, ebenso die Box-Motive (dunkelgrüner Balken). Der rote Stern zeigt die Insertion des „WLYEDIPN“-Motivs, der gelbe Stern die Mutation Y502F. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. **(B)** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der verschiedenen IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten. Die TMD ist dick schwarz markiert, die Punkte davor zeigen weitere nicht dargestellte Aminosäuren an. Die waagrechten Striche sind Platzhalter. Das Motiv „WLYEDIPN“ ist dick blau, das SOCS3 Bindemotiv rot markiert. Die Box-Motive sind unterstrichen, außerdem sind intrazelluläre Tyrosine gelb hinterlegt, wobei zusätzlich unterstrichene Tyrosine essenziell für die Signaltransduktion sind.

Zur Generierung von IL-23R-gp130-642-813 wurde zunächst eine PCR mit p409-IL-23R-gp130 (*template* A), *forward primer* (FP) hIL-23R-SnaBI (DF479) und *reverse primer* (RP) SOE-gp130-813-RP (DF802), sowie p409-IL-23R-gp130-642-765 (*template* B), FP SOE-gp130-813-FP (DF801) und RP hIL-23R-Not-rev (DF155) durchgeführt (Abb. 8A). Die zu erwartenden Fragmentlängen betrugen für (A) 800 Basenpaare (bp), für (B) 463 bp. Mittels Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion wurden die Fragmente gereinigt und in einer weiteren Agarosegelelektrophorese kontrolliert (Abb. 8B).

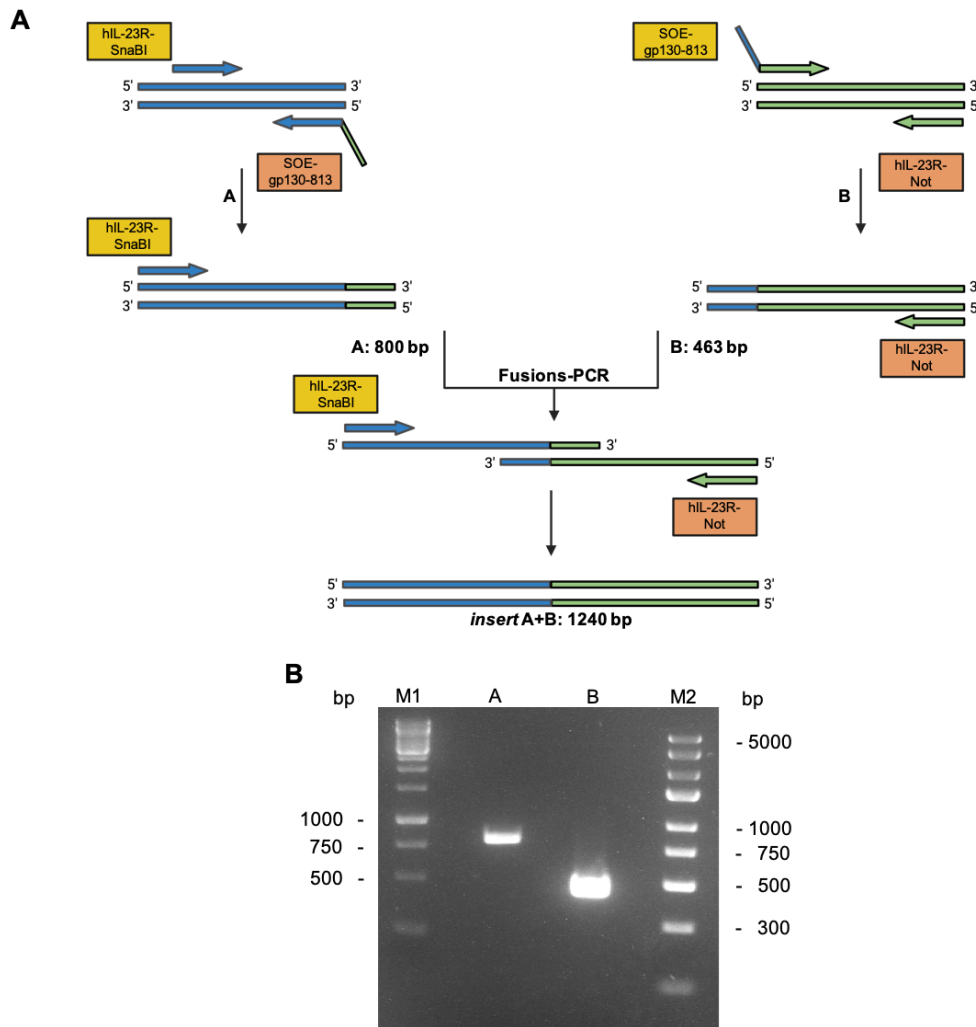


Abb. 8: Schematische Übersicht der SOE-PCR und Nachweis der PCR-Fragmente. (A) Schematische Übersicht der SOE-PCR zur Generierung des *inserts* IL-23R-gp130-642-813. Die benötigten DNA-Sequenzen (A) und (B) wurden durch Zugabe der *primer* vervielfältigt, anschließend erfolgte eine Fusions-PCR. Die Basenpaarlänge (bp) der Sequenzen und des Fusionsproduktes sind angegeben. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Kontrollgel nach Gelextraktion der DNA-Sequenzen mit den zu erwartenden Fragmentgrößen (bp) PCR (A): 800 bp, PCR (B): 463 bp. Zum Vergleich der Fragmentgrößen wurden außerdem Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* und M2 *GeneRuler™ Express ladder* aufgetragen.

Anschließend erfolgte die Fusions-PCR der beiden Fragmente (A) und (B) zu IL-23R-gp130-642-813 (1240 bp) und FP hIL-23R-SnaBI (DF479) sowie RP hIL-23R-Not-rev (DF155). Nach Kontrollgel wurde das PCR-Produkt am 5'-Ende phosphoryliert und

weiterführend durch Gelextraktion isoliert. Das entstandene *insert* wurde in den Klonierungsvektor pCR-Script ligiert, dieser lag bereits mit glatten Enden und geschnitten in der AG Scheller vor (Abb. 9A).

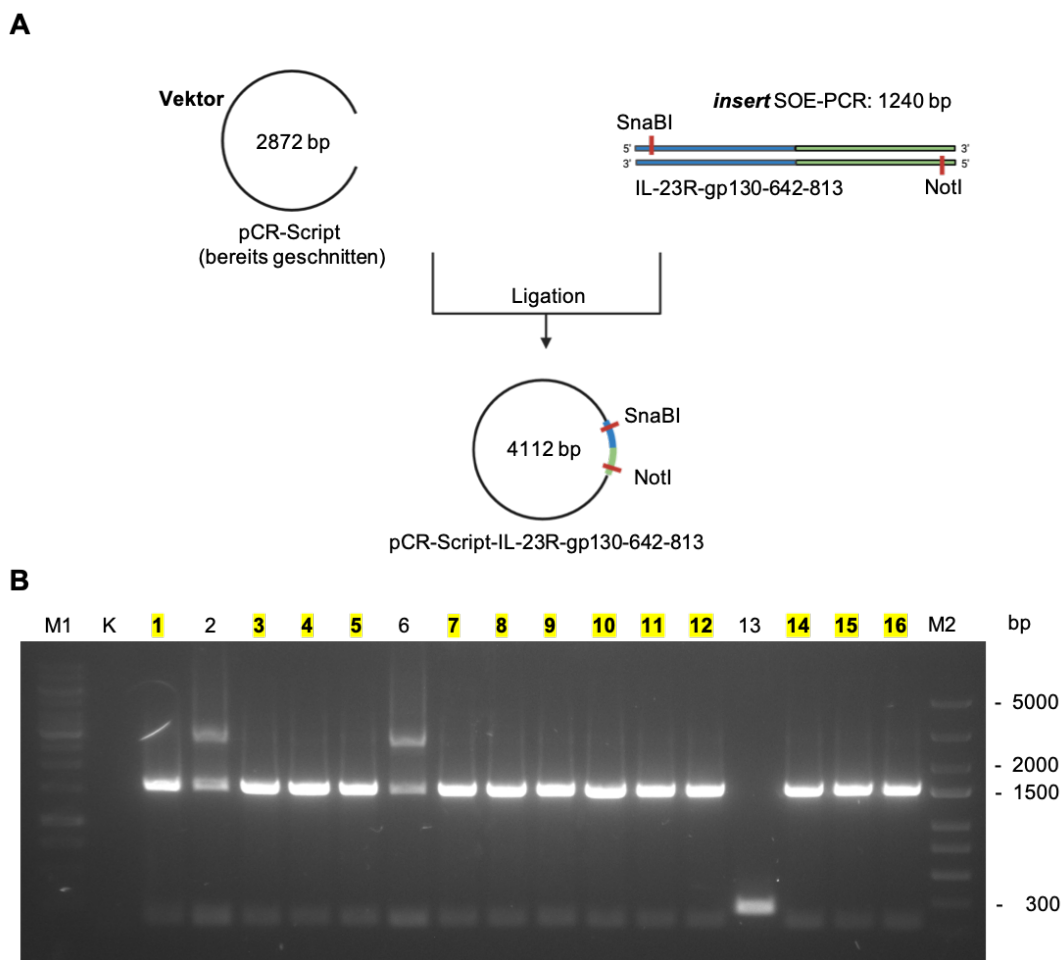


Abb. 9: Identifikation positiver Kolonien nach colony-PCR von pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813. (A) Schematische Übersicht der Generierung des Plasmids pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813. Mittels SOE-PCR wurde das *insert* generiert und anschließend in einen pCR-Script Vektor ligiert. Der Vektor lag bereits geschnitten in der AG Scheller vor. Die Fragmentgrößen (bp) sind angegeben und die Schnittstellen NotI und SnaBI im *insert* in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Nach Transformation des ligierten Plasmids pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813 in kompetente *E. coli* wurde eine colony-PCR und Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Positive Klone (gelb markiert) hatten dabei eine Fragmentlänge von 1484 bp. Als Negativkontrolle (K) fungierte H₂O. Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* und M2 *GeneRuler™ Express ladder* wurden zum Vergleich der Fragmentlängen aufgetragen.

Zur Identifikation putativ positiver Klone wurde nach Transformation des ligierten Plasmids in kompetente *E. coli* Zellen eine colony-PCR mit FP pCR-Script fwd1 (DF38) und RP pCR-Script rev1 (DF39) durchgeführt (Abb. 9B). Eindeutig positiv waren Klone mit einer Fragmentlänge von 1484 bp, demzufolge Klone 1, 3-5, 7-12 sowie 14-16. Als Negativkontrolle (K) bei der PCR fungierte H₂O. Zur weiteren Kontrolle der positiven Kolonien 8-11 wurde eine Plasmid-DNA Mini-Präparation sowie Midi-Präparation der Klone 8 und 11 und eine Restriktionsspaltung mit EcoRI durchgeführt (Abb. 10). Als Negativkontrolle (K) diente das

ungeschnittene Plasmid pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813. Zur vollständigen Kontrolle wurde außerdem eine Sequenzierung der Plasmide veranlasst. Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet.

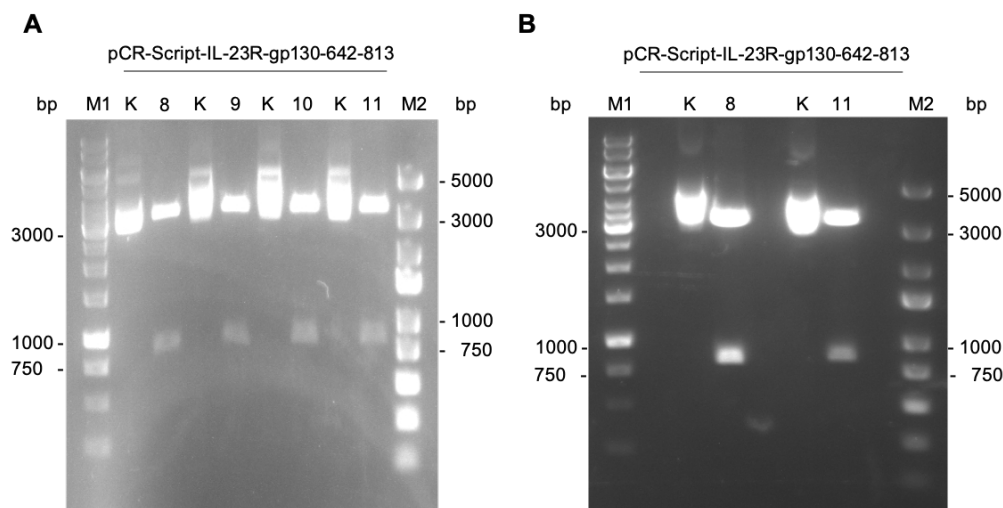


Abb. 10: Restriktionsspaltung pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813. (A) Restriktionsspaltung des Plasmids pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813 mit EcoRI nach Mini-Präparation. Die Klone #8-11 wurden vorher mittels *colony*-PCR selektiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): 813 bp und 3299 bp. Zusätzlich wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (4112 bp) sowie Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* und M2 *GeneRuler™ Express ladder* zum Vergleich aufgetragen. (B) Restriktionsspaltung mit EcoRI der Klone 8 und 11 nach Plasmid-DNA Midi-Präparation. Die erwarteten Fragmentgrößen blieben dabei gleich wie nach Mini-Präparation.

Weiterführend wurde das *insert* IL-23R-gp130-642-813 in einen p409-Expressionsvektor kloniert, um die vollständige Rezeptorvariante zu erzeugen (Abb. 11A). Das Plasmid sowie p409-IL-23R (9766 bp) wurden durch eine enzymatische Restriktionsspaltung mit SnaBI linearisiert. Nach Kontrolle in einem Agarosegel wurde die DNA mittels PCR *clean-up Kit* gereinigt, die Konzentration bestimmt und erneut in einem Agarosegel kontrolliert. Die linearisierten Plasmide wurden anschließend mit NotI geschnitten, der entstandene Vektor p409 zudem dephosphoryliert. Durch eine Gelextraktion wurde das generierte *insert* IL-23R-gp130-642-813 (1217 bp) und der Vektor (8747 bp) isoliert und in einem Agarosegel kontrolliert. Vektor und *insert* wurden in einem weiteren Schritt ligiert und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die darauffolgende *colony*-PCR wurde mit FP SOE-gp130-813-FP (DF801) und RP c-myc pR1 (DF46) für p409-IL-23R-gp130-642-813 (9964 bp) durchgeführt. Durch eine Agarosegelelektrophorese wurden putativ positive Klone anhand eines 487 bp DNA-Fragmentes identifiziert. Zur Kontrolle des Plasmids wurde nach Plasmid-DNA Mini- und Midi-Präparation ein Restriktionsspaltung mit KpnI und HindIII angesetzt. Als Negativkontrolle K diente dabei die ungeschnittene Plasmid-DNA (Abb. 11B). Anschließend wurde eine Sequenzierung der Plasmid-DNA veranlasst. Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet.

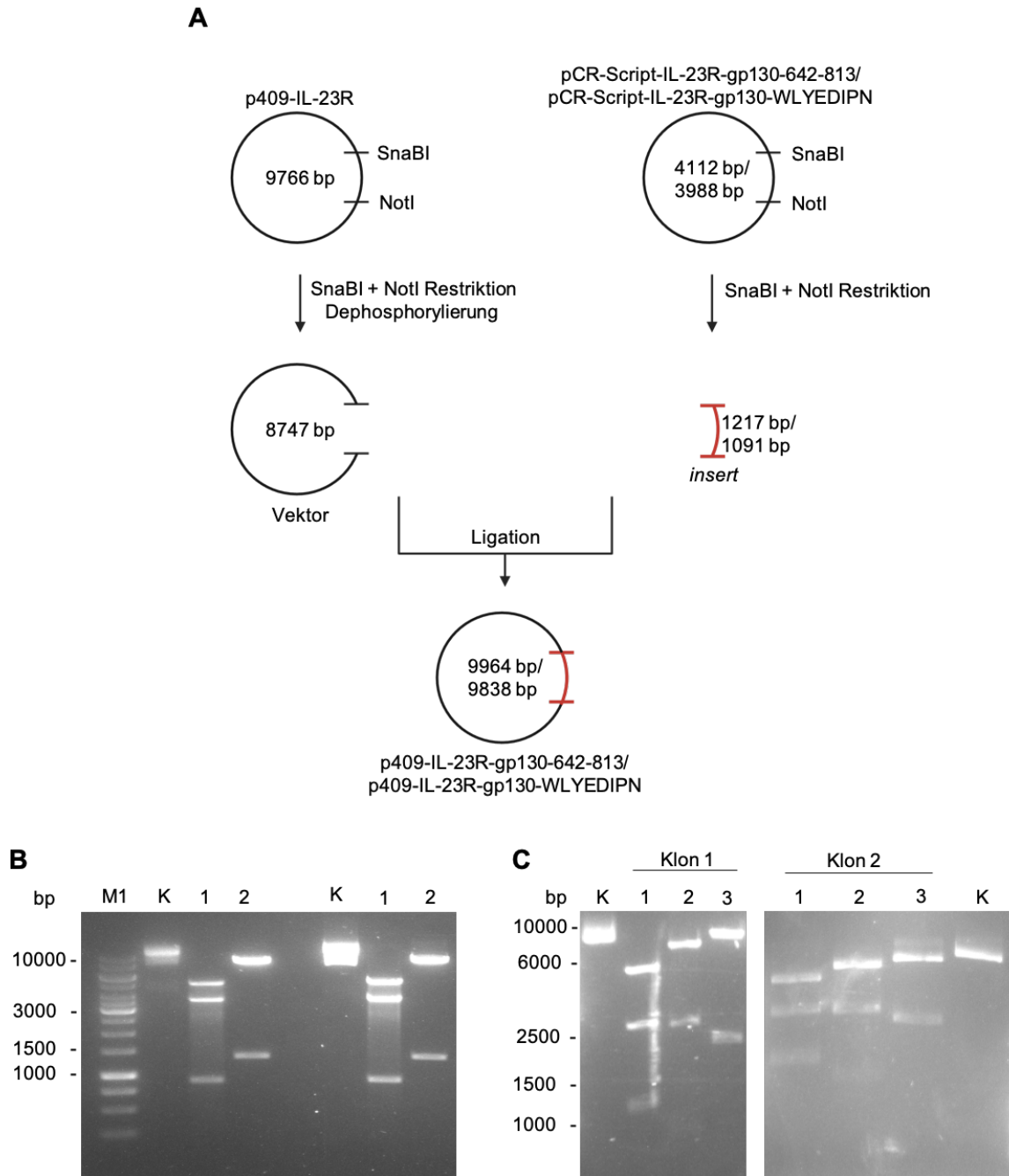


Abb. 11: Klonierung der chimären Rezeptorvarianten IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-WLYEDIPN in den eukaryotischen Expressionsvektor p409. (A) Schematische Übersicht der Klonierung von IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-WLYEDIPN in den Expressionsvektor p409. Sowohl die Ausgangsplasmide, pCR-Script-IL-23R-gp130-642-813 und pCR-Script-IL-23R-gp130-WLYEDIPN, als auch der Vektor p409-IL-23R, wurden zunächst mit SnaBI und NotI geschnitten. Die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Der Vektor wurde weiterführend dephosphoryliert. Anschließend wurden *insert* und p409-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation des klonierten Plasmids p409-IL-23R-gp130-642-813 mit KpnI (1) und HindIII (2). Jeweils zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 5438 bp, 3518 bp, 882 bp, (2) 8662 bp, 1302 bp. Zusätzlich wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (9964 bp), sowie Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen. (C) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von p409-IL-23R-gp130-WLYEDIPN mit EcoRI (1), EcoRV (2) und AflIII+NotI (3). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 5150 bp, 2436 bp, 1089bp, 1008bp, 155 bp; (2) 6710 bp, 2358bp, 770 bp; (3) 7658 bp, 1975 bp, 205 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (9838 bp) aufgetragen.

Die Rezeptorvariante IL-23R-gp130-WLYEDIPN wurde analog der Klonierung von p409-IL-23R-gp130-642-813 hergestellt. Für die Generierung von pCR-Script-IL-23R-gp130-WLYEDIPN wurde das *template* p409-IL-23R-gp130, FP hIL-23R-SnaBI (DF479), RP WLYEDIPN-RP (DF814) sowie FP WLYEDIPN-FP (DF813) und RP gp130-Not-rev (DF249) eingesetzt. Die entstandenen Fragmente (A) (642 bp) und (B) (496 bp) wurden mit FP hIL-23R-SnaBI (DF479) bzw. RP gp130-Not-rev (DF249) zu IL-23R-gp130-WLYEDIPN (1115 bp) fusioniert und in einen pCR-Script Vektor eingefügt. Dieser lag bereits geschnitten in der AG Scheller vor. Die *colony*-PCR des Ligationsprodukts pCR-Script-IL-23R-gp130-WLYEDIPN (3988 bp) wurde mit FP pCR-Script fwd1(DF38) und RP pCR-Script rev1 (DF39) durchgeführt. Putativ positive Klone hatten eine Fragmentlänge von 1360 bp Länge. Nach Plasmid-DNA Mini- und Midi-Präparation erfolgte eine Restriktionspaltung mit BglIII. Die erwarteten Fragmentlängen betrugen 264 bp und 3724 bp. Weiterführend wurden das Plasmid und p409-Vektor analog zu p409-IL-23R-gp130-642-813 linearisiert und der Vektor dephosphoryliert (Abb. 11A). Vektor (8747 bp) und *insert* (1091 bp) wurden zu p409-IL-23R-gp130-WLYEDIPN (9838 bp) ligiert. Die *colony*-PCR erfolgte mit FP WLYEDIPN-FP (DF813) und RP c-myc pR1 (DF46). Die erwartete Fragmentlänge betrug dabei 428 bp. Nach Plasmid-DNA Mini- und Midi-Präparation erfolgte eine Restriktionsspaltung mit EcoRI, EcoRV, AflIII/ NotI sowie die Sequenzierung des Plasmids (Abb. 11C). Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet.

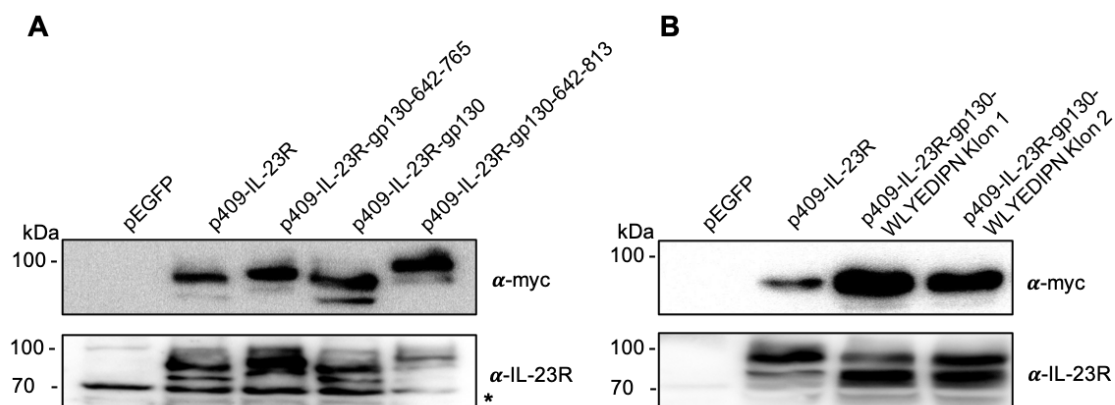


Abb. 12: Testexpression der IL-23-gp130 Rezeptorvarianten in HEK293T-Zellen. (A) Zur Kontrolle der Rezeptorexpression wurden HEK293T-Zellen transient mit den Plasmiden p409-IL-23R-gp130-642-765, p409-IL-23R-gp130 und p409-IL-23R-gp130-642-813 transfiziert. Als Negativkontrolle wurde pEGFP, als Positivkontrolle p409-IL-23R eingesetzt. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurden die Antikörper α -myc und α -IL-23R verwendet. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für IL-23R: 71,71 kDa; IL-23R-gp130-642-765: 73,02 kDa; IL-23R-gp130: 73,84 kDa; IL-23R-gp130-642-813: 78,39 kDa. *unspezifische Bande. (B) Testexpression von p409-IL-23R-gp130-WLYEDIPN in HEK293T-Zellen. Als Negativkontrolle wurde pEGFP, als Positivkontrolle p409-IL-23R eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern α -myc und α -IL-23R. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für IL-23R: 71,71 kDa; IL-23R-gp130-WLYEDIPN: 73,96 kDa.

Weiterhin wurden die klonierten Rezeptorvarianten IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-WLYEDIPN in p409, sowie die bereits vorhandenen Plasmide p409-IL-23R (Wildtyp, WT), p409-IL-23R-gp130 und p409-IL-23R-gp130-642-765 hinsichtlich ihrer Expression in HEK293T Zellen überprüft (Abb. 12). Hierfür wurden HEK293T Zellen zunächst transient mit den Plasmiden transfiziert (siehe 2.3.3), bevor sie nach 48 h lysiert wurden (siehe 2.4.1). Anschließend wurde eine SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt (siehe 2.4.5). Zur Visualisierung der Proteine wurden die Antikörper α -myc sowie α -IL-23R verwendet (siehe 2.1.2). Alle hier transfizierten Rezeptorvarianten weisen am C-Terminus einen myc *tag* auf. Die kalkulierten Molekulargewichte der Rezeptorvarianten betragen für IL-23R: 71,71 kDa; IL-23R-gp130-642-765: 73,02 kDa; IL-23R-gp130: 73,84 kDa; IL-23R-gp130-642-813: 78,39 kDa; IL-23R-gp130-WLYEDIPN: 73,96 kDa. Mit Ausnahme von pEGFP sind bei allen Rezeptorvarianten deutliche Signale zu erkennen. pEGFP dient dabei als Negativkontrolle.

3.1.1 Klonierung der IL-23R-gp130 Varianten in pMOWS-Vektoren

Um weiterführende Stimulations- und Proliferationsanalysen durchführen zu können, mussten die klonierten IL-23R-gp130 Varianten stabil in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien eingebracht werden. Hierfür wurden die Rezeptorvarianten in pMOWS-puro-Vektoren kloniert. Dabei lagen die Varianten pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-765 und pMOWS-puro-IL-23R-gp130 sowie der geschnittene und dephosphorylierte pMOWS-puro-Vektor (5782 bp) bereits in der AG Scheller vor. Die Ausgangsplasmide p409-IL-23R-gp130-642-813 und p409-IL-23R-gp130-WLYEDIPN wurden dagegen zunächst mit PmeI geschnitten (Abb. 13A). Die Plasmide besitzen jeweils zwei Schnittstellen für PmeI, sodass die cDNA für die entsprechenden Rezeptorvarianten als *insert* aus dem p409-Vektor herausgeschnitten wurde. Anschließend wurden die *inserts* IL-23R-gp130-642-813 (2253 bp) und IL-23R-gp130-WLYEDIPN (2127 bp) durch eine Gelextraktion nach Agarosegelelektrophorese isoliert. Nach Reinigung erfolgte die Messung und Kontrolle der DNA im Agarosegel.

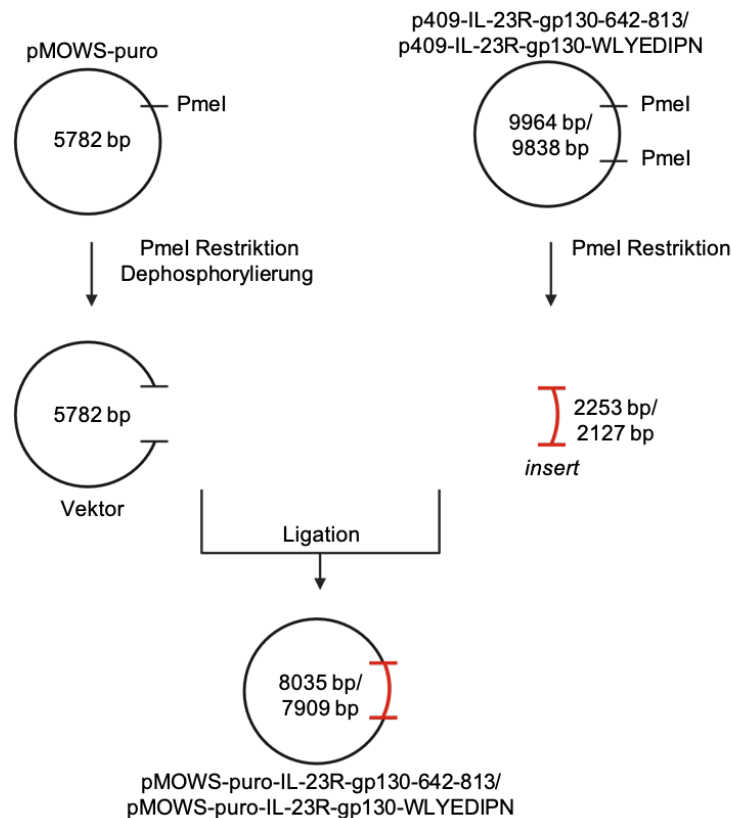
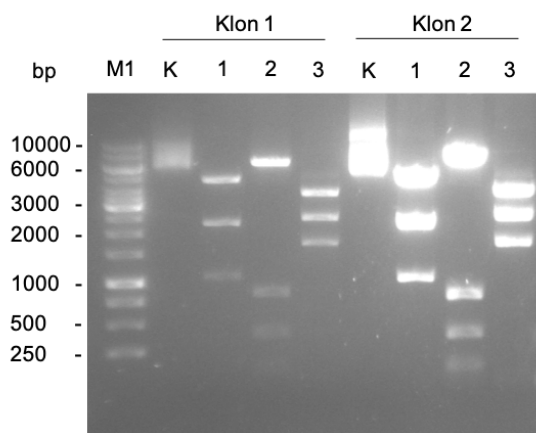
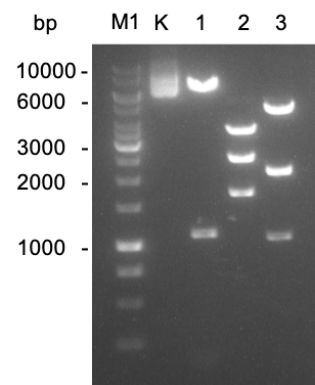
A**B****C**

Abb. 13: Klonierung der chimären Rezeptorvarianten IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-WLYEDIPN in den retroviralen Vektor pMOWS-puro. (A) Schematische Übersicht der Klonierung von pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-813 und pMOWS-puro-IL-23R-gp130-WLYEDIPN. Der pMOWS-puro-Vektor lag bereits mit PmeI geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Die Ausgangsplasmide p409-IL-23R-gp130-642-813 und p409-IL-23R-gp130-WLYEDIPN wurden mit PmeI geschnitten, die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Anschließend wurden *insert* und pMOWS-puro-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. **(B)** Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-813 mit HindIII (1), EcoRI (2), EcoRV (3). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 4768 bp, 2257 bp, 1010 bp; (2) 6590 bp, 813 bp, 402 bp, 155 bp, 41 bp, 34 bp; (3) 3787 bp, 2502 bp, 1671 bp, 75 bp. Als Kontrolle K wurde das ungeschnittene Plasmid (8035 bp) sowie Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen. **(C)** Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von pMOWS-puro-IL-23R-gp130-WLYEDIPN mit EcoRI (1), EcoRV (2) und HindIII (3). Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 6590 bp, 1089 bp, 155 bp, 41 bp, 34 bp, (2) 3661 bp, 2502 bp, 1671 bp, 75 bp und (3) 4768 bp, 2131 bp, 1010 bp. Als Kontrolle K wurde das ungeschnittene Plasmid (7909 bp), sowie der Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen.

Weiterführend wurden die *inserts* in pMOWS-puro-Vektoren ligiert und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Ebenso wurde eine *colony*-PCR zur Identifikation putativ positiver Klone mit RP 3'pMOWS (DF86) und FP hIL-23R-SnaBI-FP (DF479) für beide Rezeptorvarianten durchgeführt. Die erwarteten Fragmentlängen betrugen dabei 1424 bp (pMOWS-puro-IL-23R-gp130-WLYEDIPN) und 1550 bp (pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-813). Die Daten sind hier nicht gezeigt. Anschließend erfolgte eine Plasmid-DNA Mini- und Midi-Präparation sowie Restriktionsspaltung mit EcoRI, EcoRV und HindIII, sowie eine Sequenzierung der finalen Plasmide (Abb. 13B, 13C). Die Sequenzen waren nach Vergleich wie erwartet. Um zu differenzieren, ob Y767 des gp130 einen Einfluss auf die STAT3 Konzentration und Suppression durch SOCS3 hat, wurde das Tyrosin in der zuvor klonierten Rezeptorvariante IL-23R-gp130-642-813 zusätzlich zu Phenylalanin mutiert. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Position des Tyrosins durch die Fusion mit dem IL-23R nun an Position 502 befindet. Die Mutation wurde nur in dieser Rezeptorvariante durchgeführt, da die Rezeptorvarianten IL-23R-gp130 und IL-23R-gp130-WLYEDIPN die vollständige Signalkaskade von gp130 abbilden sollten. Zudem war das Tyrosin aufgrund der Länge des gp130-Anteils in der Variante IL-23R-gp130-642-765 grundsätzlich nicht vorhanden. Die Mutation wurde mittels SDM-PCR in das pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-813 Plasmid eingeführt. Als FP wurde Y502F_P1 (DF819), als RP Y502F_P2 (DF820) eingesetzt. Anschließend wurde die DNA mit dem PCR *clean-up* Kit gereinigt, mit DpnI enzymatisch gespalten und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Es folgte eine Isolation der Plasmid-DNA, sowie eine Restriktionsspaltung mit HindIII (Abb. 14). Zur vollständigen Kontrolle wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet.

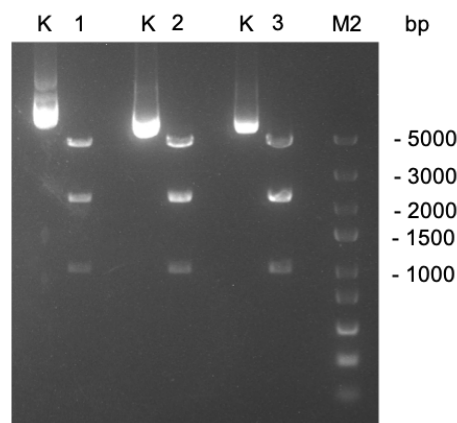
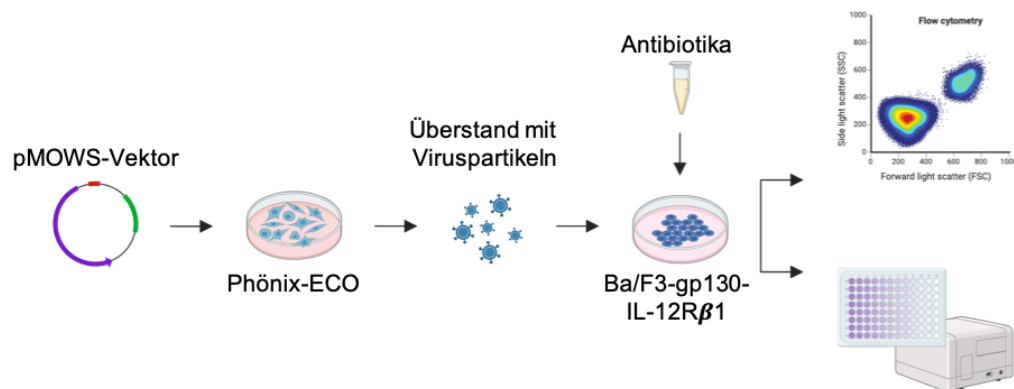


Abb. 14: Restriktionsspaltung des Plasmids pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-813 Y502F. Nach SDM wurde eine Plasmid-DNA-Isolation und anschließend eine Restriktionsspaltung mit HindIII durchgeführt. Drei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): 4768 bp, 2275 bp, 1010 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (8035 bp), sowie Marker M2 *GeneRuler™ Express ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen.

3.1.2 Expression der Rezeptorvarianten in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien

Nachdem alle fünf IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten in pMOWS-Vektoren vorlagen, konnten diese für weiterführende Analysen stabil in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien transduziert werden. Dafür wurden die Plasmide zunächst in die Verpackungszelllinie Phönix-ECO transfiziert (Abb. 15A). Nach 72 h wurde der Überstand der Phönix-ECO Zellen für die retrovirale Transduktion zu den Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen gegeben. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit HIL-6 kultiviert. Ba/F3-gp130 Zellen proliferieren durch Zugabe von HIL-6, einem Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, das IL-6 *trans-signaling* induziert [141]. Nach Transduktion der Ba/F3-gp130 Zellen mit den cDNAs für IL-12R β 1 sowie IL-23R proliferieren die Zellen außerdem durch Zugabe von HIL-23. Auch HIL-23 ist ein Fusionsprotein, bestehend aus den IL-23 Untereinheiten p19 und p40. Diese werden analog zum HIL-6 mit einem Peptidlinker verbunden [43].

A



B

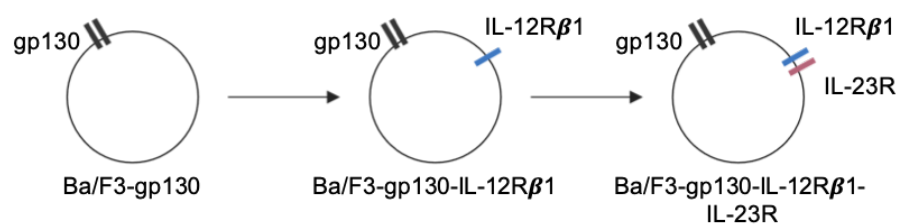


Abb. 15: Generierung stabiler Ba/F3-Zelllinien mittels retroviraler Transduktion. (A) Zur Generierung stabiler Ba/F3-Zelllinien wurden retrovirale pMOWS-Vektoren eingesetzt. Die pMOWS-Plasmide wurden zunächst in Phoenix-ECO Zellen transfiziert. Der Zellüberstand wurde anschließend zur Transduktion der Plasmide in Ba/F3-Zellen genutzt. Nach Antibiotikaselektion der transduzierten Ba/F3-Zellen wurden diese hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression und ihres Wachstumsverhaltens überprüft. (B) Herstellung stabiler Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zelllinien. Ba/F3-gp130 Zellen lagen bereits in der AG Scheller vor. Durch retrovirale Transduktion wurde zunächst die cDNA für IL-12R β 1 in die Ba/F3-Zellen eingebracht. Anschließend wurde außerdem die cDNA für IL-23R mittels retroviraler Transduktion eingebracht. Die Abbildungen wurden erstellt mit BioRender.com.

Die retroviral transduzierten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen wurden für 48 h inkubiert, bevor die Zellen durch Zugabe von Antibiotika selektiert wurden. Dabei wurde Puromycin als auch Hygromycin B verwendet. Die transduzierten IL-23 Rezeptorvarianten besitzen eine Puromycinresistenz durch Verwendung eines pMOWS-puro Vektors. Der IL-12R β 1 zeigt dagegen eine Hygromycin B-Resistenz, da hier ein pMOWS-hygro Vektor eingesetzt wurde. Dementsprechend sollten die Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien bei korrekter Expression der bereits bestehenden Rezeptoren sowie transduzierter Rezeptorvarianten trotz Antibiotikagabe weiterhin proliferieren. Nach Antibiotikaselektion und Passage der Zellen über 2-3 Wochen wurde die Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 16). Zur Detektion des bereits etablierten Rezeptors IL-12R β 1 wurde der Antikörper α -IL-12R β 1-PE (Abb. 16A), zur Detektion der Rezeptorvarianten der Antikörper α -IL-23R-bio (Abb. 16B) eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten dabei jeweils Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression des IL-23R, die in der AG Scheller kontrolliert und stetig passagiert wurden. Das grau hinterlegte Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen, die weder den IL-12R β 1 noch den IL-23R exprimieren und als Negativkontrolle dienen. Eine Verschiebung der Histogramme davon ausgehend nach rechts verdeutlicht die Expression von IL-12R β 1 als auch von IL-23R bzw. den IL-23R-gp130 Varianten in den Ba/F3-gp130 Zellen. Alle hierbei untersuchten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien zeigen somit eine Expression sowohl von IL-12R β 1 als auch von IL-23R- bzw. den IL-23R-gp130 Varianten, wobei die Rezeptorvarianten IL-23R-gp130 und IL-23R-gp130-642-813 im Vergleich zu den anderen Zelllinien nur eine geringe Verschiebung bei der Detektion des IL-23R zeigen und somit eine geringere Oberflächenexpression aufweisen (Abb. 16B). Die Durchflusszytometrie der Zelllinie Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130 und Detektion des IL-23R wurde von PD Dr. Doreen M. Floss wiederholt und bestätigt die Expression der Rezeptorvariante (siehe ergänzende Abb. 7).

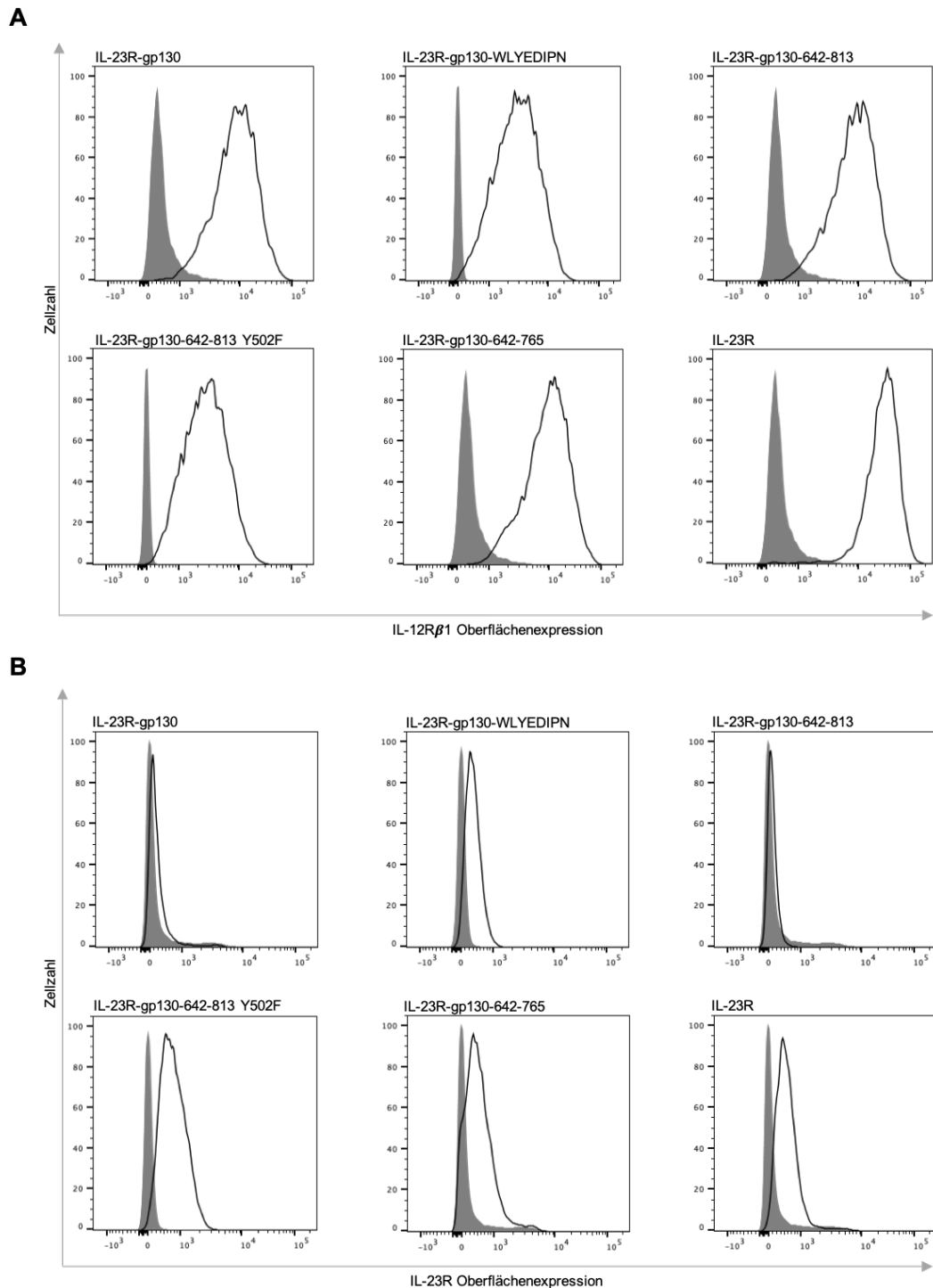


Abb. 16: Analyse der Oberflächenexpression von IL-23-gp130-Rezeptorvarianten in stabilen Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression der IL-23-gp130-Rezeptorvarianten in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen überprüft. Die Y-Achse der Histogramme zeigt die Zellanzahl, die X-Achse ist ein Maß für die Fluoreszenzintensität und zeigt somit die Oberflächenexpression des jeweiligen Rezeptors. **(A)** Detektion von IL-12R β 1. Die grau hinterlegte Kurve repräsentiert Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle), das weiße Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression von IL-12R β 1. Als Antikörper wurde α -IL-12R β 1-PE verwendet. **(B)** Detektion der IL-23R Expression mittels α -IL-23R-bio und sekundärer Zugabe von Streptavidin-APC. Ba/F3-gp130 Zellen (graue Kurve) wurden als Negativkontrolle, Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen als Positivkontrolle verwendet. Das weiße Histogramm zeigt Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit IL-23-Rezeptorvarianten.

3.1.3 Funktionelle Charakterisierung der erzeugten Ba/F3-Zelllinien

Weiterhin wurden die Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens und intrazellulärer Signaltransduktion überprüft (Abb. 17). Zur Analyse des Proliferationsverhaltens wurden die Zellen 72 h ohne Zytokin, mit 0,2% HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 und 1 µg/ml HIL-23 kultiviert (siehe 2.3.6). Ba/F3-gp130 Zellen proliferieren durch Zugabe von HIL-6, einem Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, das IL-6 *trans-signaling* induziert [141]. Nach Transduktion der Ba/F3-gp130 Zellen mit den cDNAs für IL-12Rβ1 sowie IL-23R bzw. den IL-23R Varianten proliferieren die Zellen außerdem durch Zugabe von HIL-23. Auch HIL-23 ist ein Fusionsprotein, bestehend aus den IL-23 Untereinheiten p19 und p40. Diese werden analog zum HIL-6 mit einem Peptidlinker verbunden [43].

Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Diese wachsen ausschließlich durch Zugabe von HIL-6. Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zellen aus der AG Scheller wurden als Positivkontrolle genutzt. Trotz der geringen Oberflächenexpression von IL-23R-gp130 und IL-23R-gp130-642-813 (Abb. 16B) zeigen beide Zelllinien eine Funktionalität in der Proliferationsanalyse (Abb. 17A). Dies zeigt, dass die Rezeptorvarianten auf den Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert sein müssen. Auffällig bei Stimulation der Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zelllinie ist, dass die Proliferation mit steigender IL-23 Konzentration abnimmt und bei Zugabe von 1 µg/ml HIL-23 kein Wachstum mehr vorhanden ist. Dieses Phänomen wurde in der Masterarbeit von Sofie Beier näher analysiert, allerdings konnte bisher keine genaue Ursache für dieses Verhalten identifiziert werden. Anders verhält es sich bei den IL-23R-gp130 Varianten. Hier sieht man auch bei einer Stimulation mit 1 µg/ml HIL-23 eine stetige Proliferation. Eine Ausnahme stellen jedoch Zellen mit Expression der IL-23R-gp130-WLYEDIPN Rezeptorvariante dar. Diese ähneln dem Wachstumsverhalten der Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zellen und proliferieren bei Zugabe von 1 µg/ml HIL-23 nicht mehr. Dies ist ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der Ba/F3-gp130 Zellen mit dem IL-23 Rezeptor. Da das Hintergrundsignal der Proliferationsanalysen im Rahmen der Dissertation recht hoch war, wurde sich in weiteren Analysen auf die STAT3 Aktivierung fokussiert.

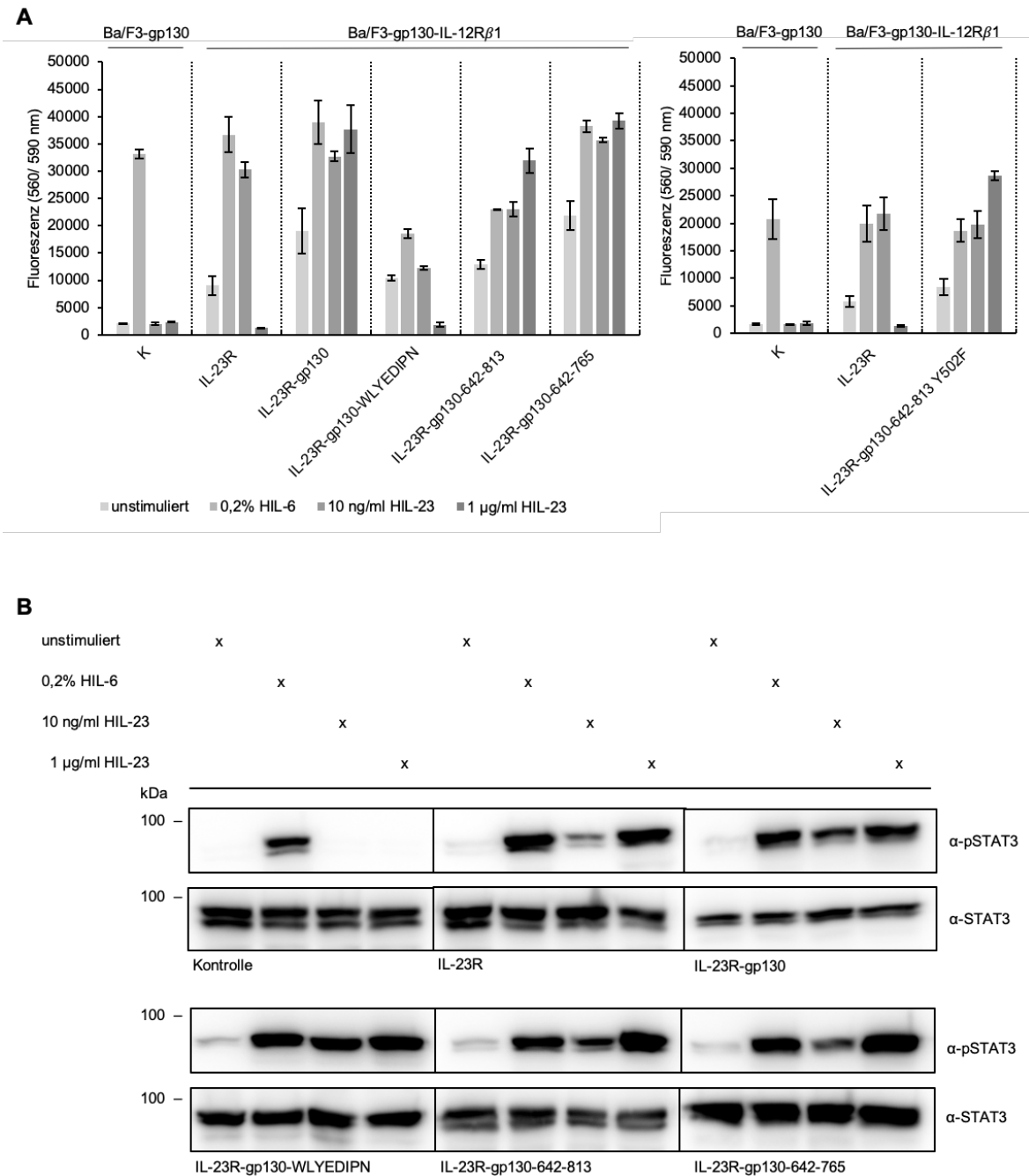


Abb. 17: Analyse des Wachstumsverhaltens und der STAT3 Aktivierung stabiler Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit IL-23-gp130 Rezeptorvarianten. (A) Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit Expression der IL-23-gp130 Rezeptorvarianten, sowie des IL-23R Wildtyps wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in unterschiedlichen Konditionen untersucht. Als Negativkontrolle K wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 72 h ohne Zytokin (weiß), mit 0,2 % HIL-6 (hellgrau), 10 ng/ml HIL-23 (grau) und 1 μ g/ml HIL-23 (dunkelgrau) kultiviert, bevor die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] am Fluorometer gemessen wurde. n=3 **(B)** Analyse der STAT3 Aktivierung in stabilen Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit Expression der IL-23-gp130 Rezeptorvarianten in unterschiedlichen Konditionen. Ba/F3-gp130 Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Zellen wurden unstimuliert gelassen, sowie 30 min mit 0,2 % HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 und 1 μ g/ml HIL-23 inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und Western Blot. Zur Detektion wurden die Antikörper α -STAT3 und α -pSTAT3 eingesetzt. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. n=2

Zur Analyse der intrazellulären Signaltransduktion wurden die Zellen zunächst für 4 h *gestarved*, anschließend wurden diese analog der Proliferationsanalyse stimuliert (siehe 2.3.8). Nach 30 min erfolgten die Ernte und Lyse der Zellen sowie Western Blot. Da insbesondere der JAK/STAT-Weg bei der IL-6 sowie IL-23 Signaltransduktion relevant ist, lag der Fokus auf der Analyse der STAT3 Aktivierung. Zur Detektion der intrazellulären Signalproteine wurden deshalb die Antikörper α -STAT3 und α -pSTAT3 eingesetzt (Abb. 17B). Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. Eine Proteinbande bei α -pSTAT3 signalisiert eine Aktivierung von STAT3, dabei ist die Aktivität umso höher, je dunkler die Bande sich darstellt. Auch hier wurden Ba/F3-gp130 Zellen als Negativkontrolle genutzt, eine Aktivierung von STAT3 ist dementsprechend nur nach Stimulation mit HIL-6 sichtbar. Alle anderen Zelllinien zeigen eine Aktivierung von STAT3 in allen stimulierten Konditionen mit HIL-23 (Abb. 17B).

3.1.4 Chimäre IL-23R-gp130 Varianten induzieren SOCS Suppression

Nachdem alle IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten stabil in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien etabliert und hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens und intrazellulärer Signaltransduktion untersucht worden waren, folgten weiterführende Stimulationsanalysen. Der Fokus lag dabei auf der STAT3 Aktivierung und möglicher Suppression durch SOCS3. Die Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen bzw. mit -IL23R-gp130 Varianten wurden hierfür zunächst für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert und anschließend mit 10 ng/ml HIL-6 bzw. 10 ng/ml HIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 (unstimuliert), nach 30 min und anschließend stündlich über einen Zeitraum von 5 h geerntet und lysiert. Mittels Western Blot und Zugabe von α -SOCS3, α -STAT3 und α -pSTAT3 wurden die intrazellulären Signalproteine visualisiert. SOCS3 hat dabei ein kalkuliertes Molekulargewicht von 24,78 kDa in Ba/F3-Zellen, STAT3 und pSTAT3 80 kDa.

Bei Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression des IL-23R WT ist eine steigende SOCS3 Expression und gleichzeitig abnehmende STAT3 Aktivität nach 1 h zu erkennen (Abb. 18B). Eine Stimulation der Zellen mit HIL-6 ist auch ohne Expression des IL-6R mittels *trans-signaling* über den gp130 Rezeptor möglich [107]. Nach 3 h nimmt auch SOCS3 wieder ab. Da eine Hemmung der STAT3 Aktivität durch SOCS3 im IL-6 Signalweg als belegt gilt, dient eine Stimulation der weiteren Zellen mit HIL-6 als Positivkontrolle. Nach Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml HIL-23 ist SOCS3 nach etwa 2 h ebenso nachweisbar, allerdings bleibt die STAT3 Aktivierung unbeeinflusst. Dieser Effekt wurde bereits für murine als auch für synthetische IL-23R, beschrieben [81, 86].

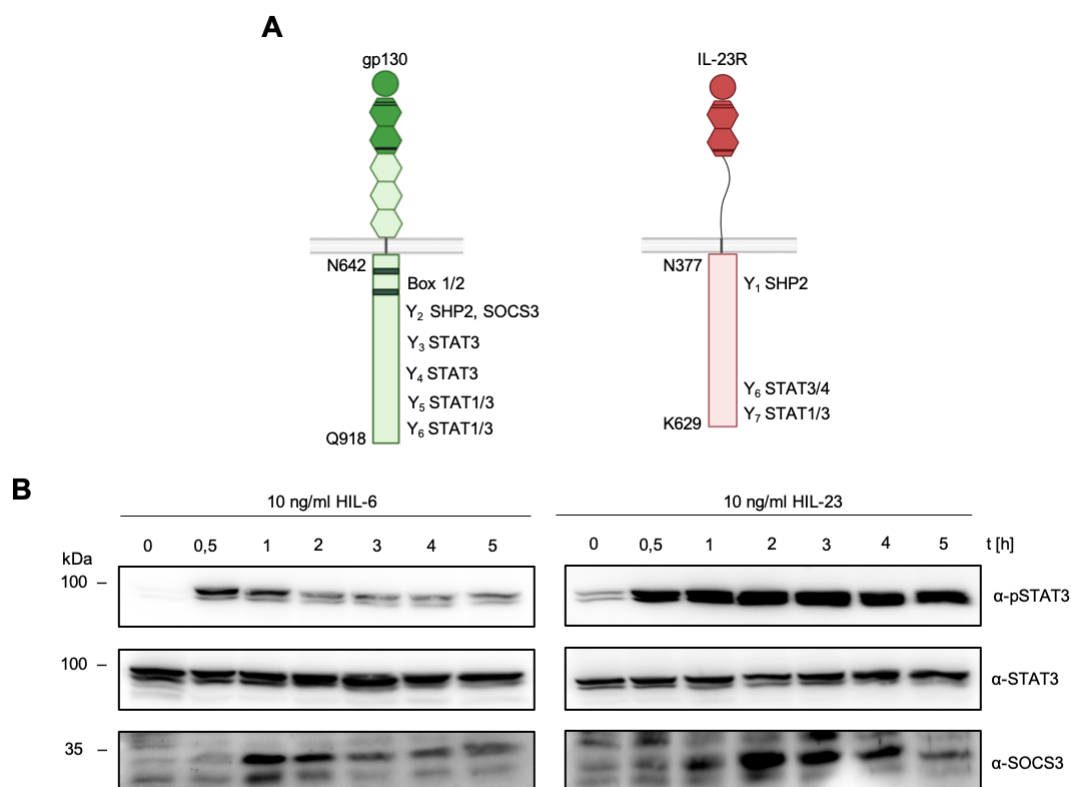


Abb. 18: Analyse der STAT3 Aktivierung und SOCS3 *feedback*-Hemmung nach Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R. (A) Schematische Übersicht der Rezeptoren IL-23R und gp130. Wichtige Tyrosine zur Signaltransduktion, Box-Motive, sowie Beginn und Ende der intrazellulären Domäne sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Stabile Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression des IL-23R wurden für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert, anschließend mit 10 ng/ml HIL-6 bzw. HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h stimuliert. Nach Lyse der Zellen und Western Blot erfolgte die Detektion von SOCS3, STAT3 und pSTAT3 mittels Zugabe von Antikörpern. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für SOCS3 in Ba/F3-Zellen 24,78 kDa, für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. Ein repräsentatives Ergebnis von n=3 ist abgebildet.

Anders verhält es sich bei Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression der Rezeptorvariante IL-23R-gp130 (Abb. 19B). Ein Anstieg der SOCS3 Expression nach Stimulation mit HIL-23 ist nach 1 h zu detektieren. Dabei ist auffällig, dass die STAT3 Aktivität wie bei Stimulation mit HIL-6 nach 2 h abnimmt.

Bei Zellen mit Expression der Rezeptorvariante IL-23R-gp130-WLYEDIPN wurde aufgrund des fehlenden SOCS3-Motivs erwartet, dass eine Hemmung durch SOCS3 nicht mehr stattfinden würde. Diesbezüglich konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit keine eindeutige Aussage getroffen werden, da in manchen Untersuchungen eine Abnahme der STAT3 Aktivität zu beobachten war (Abb. 19C), in weiteren Stimulationen die Abnahme jedoch nicht so deutlich erschien (Abb 19D). In fortfolgenden, inzwischen veröffentlichten Analysen durch Leorina Kashtanjeva konnte jedoch bestätigt werden, dass eine Hemmung von STAT3 durch SOCS3 in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-gp130-WLYEDIPN nicht stattfindet [145].

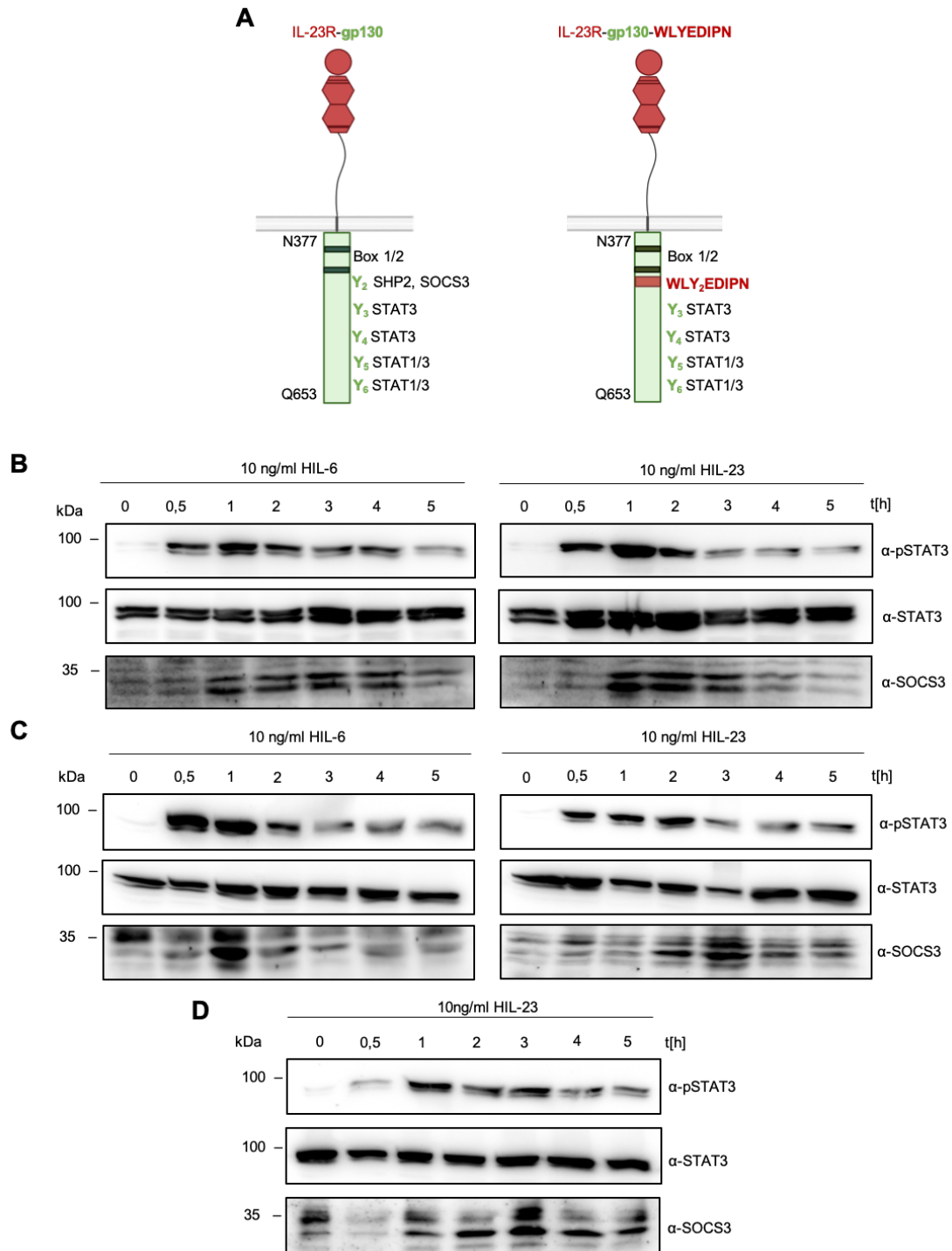


Abb. 19: Analyse der STAT3 Aktivierung und SOCS3 *feedback*-Hemmung nach Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-gp130 bzw. IL-23R-gp130-WLYEDIPN. (A) Schematische Übersicht der Rezeptorvarianten IL-23R-gp130 und IL-23R-gp130-WLYEDIPN. Intrazelluläre Tyrosine zur Signaltransduktion, Beginn und Ende der intrazellulären Domäne, sowie Box-Motive sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. **(B)** Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130 Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 bzw. HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h. Zuvor wurden die Zellen für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert. Nach Lyse der Zellen und Western Blot erfolgte die Detektion von SOCS3, STAT3 und pSTAT3 mittels Zugabe von Antikörpern. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für SOCS3 in Ba/F3-Zellen 24,78 kDa, für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. n=3 **(C)** Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130-WLYEDIPN Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 und HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h. n=3. **(D)** Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130-WLYEDIPN Zellen mit HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h. n=3

In Zellen mit Expression des IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-642-813 Y502F ist dagegen eine Abnahme der STAT3 Aktivität nach Zunahme von SOCS3 zu erkennen (Abb. 20). Dies wurde in weiteren Arbeiten der AG Scheller validiert [145].

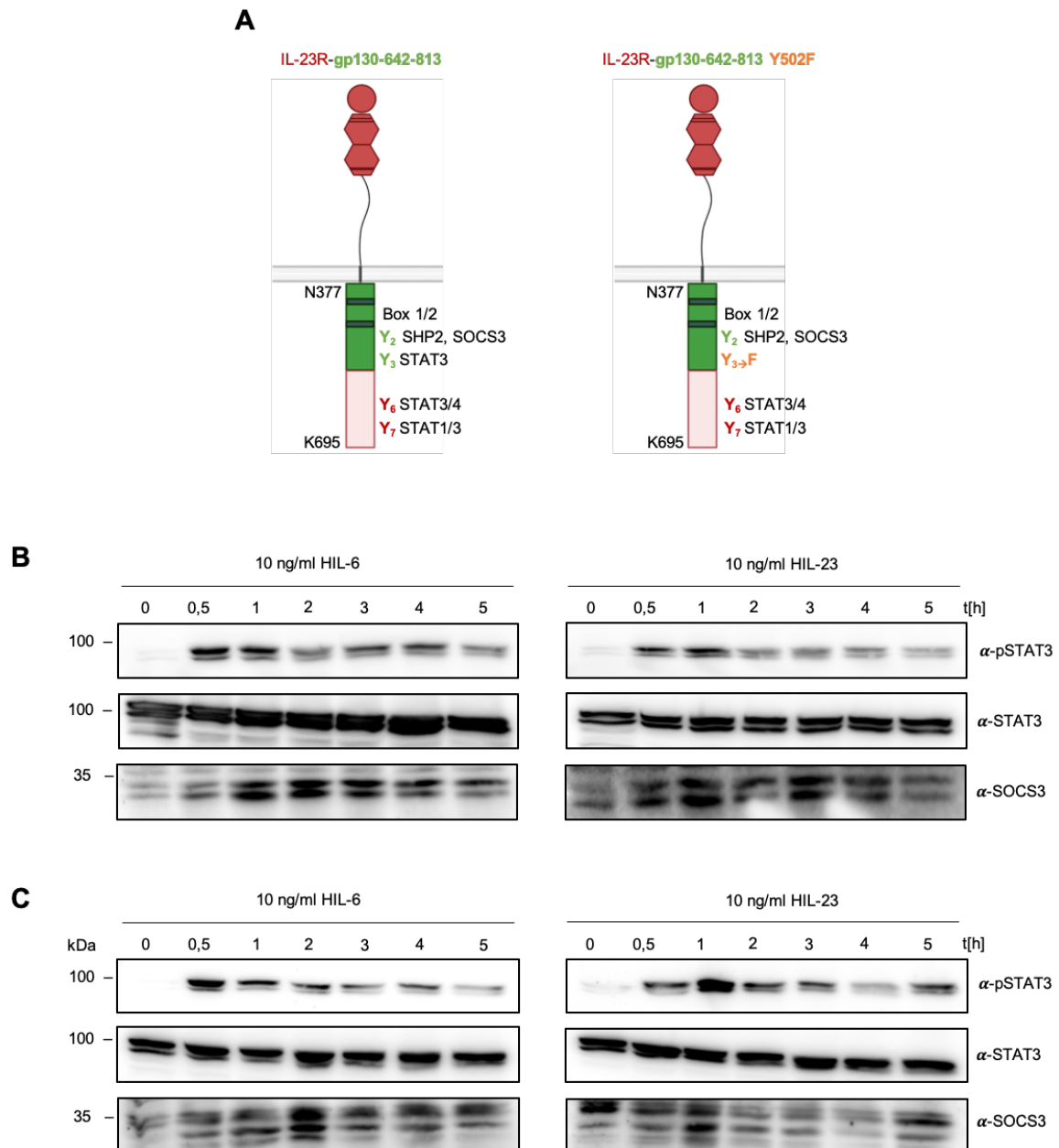


Abb. 20: Analyse der STAT3 Aktivierung und SOCS3 *feedback*-Hemmung nach Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-642-813 Y502F. (A) Schematische Übersicht der Rezeptorvarianten IL-23R-gp130-642-813 und IL-23R-gp130-642-813 Y502F. Wichtige Tyrosine zur Signaltransduktion, Box-Motive, sowie Beginn und Ende der intrazellulären Domäne sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130-642-813 Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 bzw. HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h. Zuvor wurden die Zellen für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert. Nach Lyse der Zellen und Western Blot erfolgte die Detektion von SOCS3, STAT3 und pSTAT3 mittels Zugabe von Antikörpern. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für SOCS3 in Ba/F3-Zellen 24,78 kDa, für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. n=3 (C) Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130-642-813 Y502F Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 und HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h. n=3

Gleiches gilt auch, wenn der gp130 Anteil im IL-23R noch kürzer wird. Die Phosphorylierung von STAT3 scheint bei zunehmender SOCS3 Konzentration nach Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130-642-765 Zellen mit HIL-23 abzunehmen (Abb. 21B). Die Supprimierung von STAT3 nach Stimulation mit HIL-6 war in diesen Zelllinien hingegen nicht so offensichtlich, konnte aber in nachfolgenden Analysen von Leorina Kashtanjeva deutlich nachgewiesen werden [145].

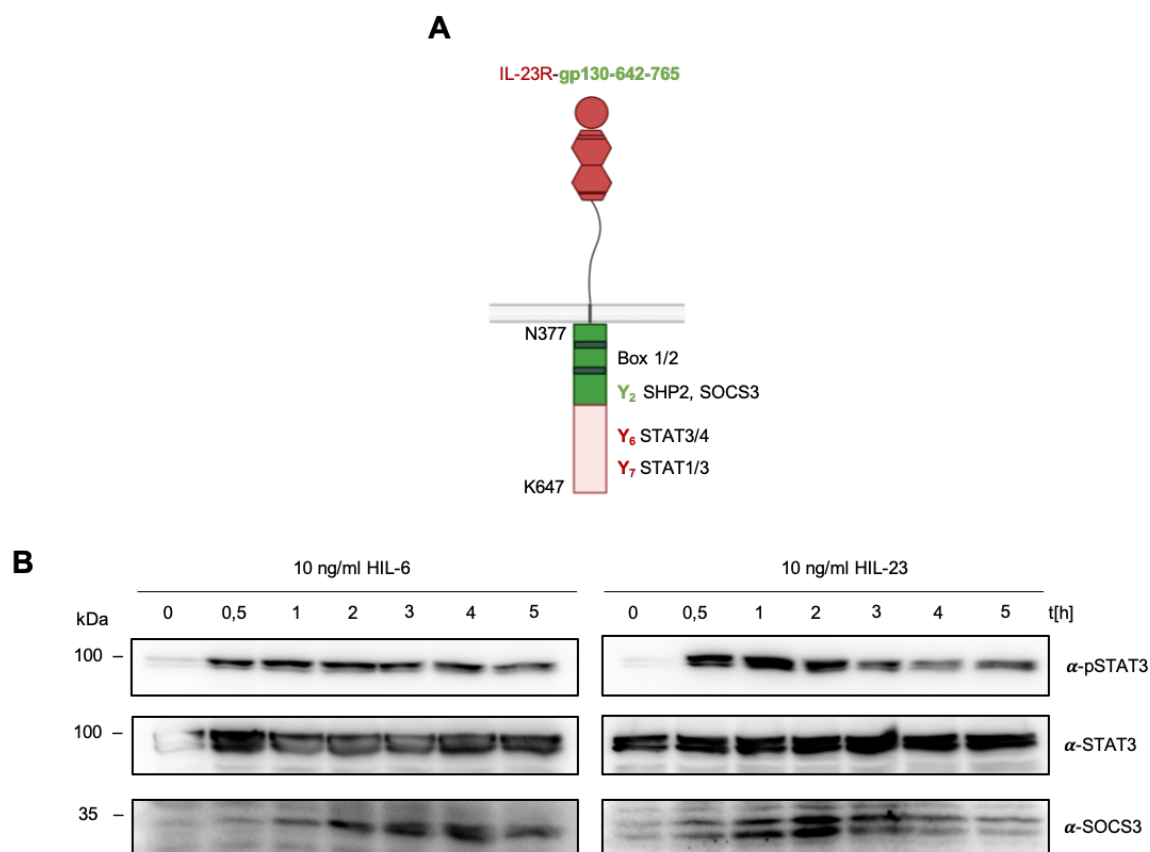


Abb. 21: Analyse der STAT3 Aktivierung und SOCS3 *feedback*-Hemmung nach Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-gp130-642-765. (A) Schematische Übersicht der Rezeptorvariante IL-23R-gp130-642-765. Beginn und Ende der intrazellulären Domäne, wichtige Tyrosine zur Signaltransduktion und Box-Motive sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. **(B)** Stabile Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression der Rezeptorvariante IL-23R-gp130-642-765 wurden für 4 h in Serum-freien Medium inkubiert, anschließend mit 10 ng/ml HIL-6 bzw. HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h stimuliert. Nach Lyse der Zellen und Western Blot erfolgte die Detektion von SOCS3, STAT3 und pSTAT3 mittels Zugabe von Antikörpern. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für SOCS3 in Ba/F3-Zellen 24,78 kDa, für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. n=3

3.2 Chimäre IL-23 Rezeptorvarianten mit SOCS3 Bindemotiven

Für eine tiefergehende Analyse und Charakterisierung der Sequenzmotive zur SOCS3 Interaktion wurden neben den IL-23R-gp130 Varianten sechs weitere chimäre Rezeptoren kloniert, wobei fünf Rezeptoren bereits in der AG Scheller vorlagen (Abb. 22). Ausschließlich die Rezeptorvariante IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) wurde im Rahmen dieser

Arbeit kloniert. Für alle chimären Rezeptorvarianten diente auch hier gp130 und insbesondere das SOCS3 Bindemotiv des gp130 „VQYSTVVH“ als Vorlage. Neben dem Tyrosin scheinen die Valine an Position Y-2, +3 und +4 eine wichtige Rolle für die Bindung von SOCS3 zu spielen [112, 116]. Um zu untersuchen, ob Valine auch ausschlaggebend für eine SOCS3 Interaktion im IL-23R sind, wurden deshalb zunächst einzelne Aminosäuren zu Valine verändert. Im IL-23R liegt das Tyrosin, das Y759 im gp130 aufgrund der Bindung von SHP2 am ähnlichsten ist, an Position 397. In der Rezeptorvariante IL-23R W395V wurde die Aminosäure W395 (Y-2) zu einem Valin mutiert. Weiterführend wurde eine IL-23R-VV und IL-23R-VVV Variante kloniert. Bei IL-23R-VV wurde Isoleucin und Prolin an Positionen 400 und 401 zu Valinen mutiert, bei IL-23R-VVV wurden alle drei Mutationen eingeführt (W395V, I400V, P401V). In den drei weiteren Varianten wurde dagegen das vollständige SOCS3 Bindemotiv des gp130 verwendet. „VQYSTVVH“ ersetzt im IL-23R-SOCS-A die „WLYEDIPN“-Sequenz um Y397. Da im IL-23R allerdings nur 18 Aminosäuren zwischen TMD und W395 liegen und im gp130 115 Aminosäuren zwischen TMD und V757, wurde das „VQYSTVVH“-Motiv in der Variante IL-23R-SOCS-B nach C-terminal verlagert. Es liegt hier um Y476 (474-481) des IL-23R. In IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) wurde „STASTVEYSTVVHS“ um Y476 gesetzt. „VEYSTVVH“ ist das SOCS3 Bindemotiv des murinen gp130 Rezeptors und unterscheidet sich somit nur in einer Aminosäure (Q -> E) zum humanen gp130 Rezeptor [34]. Bis auf IL-23R-SOCS-C lagen alle Rezeptorvarianten bereits in pMOWS-puro-Vektoren in der AG Scheller vor (Doreen M. Floss, Dissertation Franz Christian Horstmeier [136]).

IL-23R WT	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK WLYEDIPN MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R W395V	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK VLYEDIPN MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R I400V P401V	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK VLYEDVVN MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R W395V I400V P401V	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK VLYEDVVN MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R-VQYSTVVH-SOCS-A	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK VQYSTVVH MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R-VQYSTVVH-SOCS-B	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK WLYEDIPN MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R-STASTVEYSTVVHSG-SOCS-C	...SLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPK WLYEDIPN MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYV	430
IL-23R WT	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTTVV Y IPDLNTGYKPKISN...	490
IL-23R W395V	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTTVV Y IPDLNTGYKPKISN...	490
IL-23R I400V P401V	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTTVV Y IPDLNTGYKPKISN...	490
IL-23R W395V I400V P401V	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTTVV Y IPDLNTGYKPKISN...	490
IL-23R-VQYSTVVH-SOCS-A	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTTVV Y IPDLNTGYKPKISN...	490
IL-23R-VQYSTVVH-SOCS-B	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSLFDNTT VQYSTVVH GYKPKISN...	490
IL-23R-STASTVEYSTVVHSG-SOCS-C	DPMITEIKEIFIPKHKPTD Y KKENTGPLETRD Y PQNSL STASTVEYSTVVHSG YKPKISN...	490

Abb. 22: Gegenüberstellung der Aminosäureabfolge weiterer IL-23R Rezeptorvarianten. Dargestellt sind die verschiedenen IL-23R Varianten im Bereich von S371 bis N490. Die Punkte davor und danach stellen weitere Aminosäuren dar. Dick schwarz markiert ist die Transmembrandomäne (L356-F376), dick blau das „WLYEDIPN“-Motiv um Y397 und gelb die in diesem Abschnitt vorhandenen Tyrosine. Die zusätzlich unterstrichenen Tyrosine Y397 und Y484 sind essenziell für die intrazelluläre Signaltransduktion. In rot sind die im Vergleich zum Wildtyp IL-23R veränderten Aminosäuren dargestellt, dabei wurde das SOCS3 Bindemotiv „VQYSTVVH“ des humanen gp130 als Vorlage verwendet. Grün markiert ist dagegen das Bindemotiv des murinen gp130.

3.2.1 Klonierung von IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 Vektoren

Analog zur Klonierung der IL-23R-gp130 Varianten musste die IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) Variante zunächst aus vorliegenden Plasmiden mittels SOE-PCR hergestellt und in einen pCR-Script-Vektor ligiert werden. Als *template* (A) wurde dafür p409-IL-23R, als *template* (B) p409-IL-23R-SOCS-B verwendet und die PCR für (A) mit FP hIL-23R-SnaBI (DF479) und RP SOCS-C-SOE-RP (DF822) sowie für (B) mit FP SOCS3-C-SOE-FP (DF821) und RP hIL-23R-Not-rev (DF155) angesetzt (siehe 2.2.11). Nach Reinigung der PCR-Produkte (A): 570 bp und (B): 492 bp wurden diese in einer Fusions-PCR mit FP hIL-23R-SnaBI (DF479) und RP hIL-23R-Not-rev (DF155) zu IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (1042 bp) vereint. Anschließend erfolgte die Ligation in pCR-Script. Der Vektor lag bereits geschnitten in der AG Scheller vor. Das Plasmid wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und eine *colony*-PCR mit pCR-Script fwd1 (DF38) und pCR-Script rev1 (DF39) zur Identifikation putativ positiver Klone (Fragmentlänge: 1287 bp) veranlasst. Weiterhin wurde eine Restriktionsspaltung mit EcoRI (615 & 3300 bp) und Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurde die Mutation S482T festgestellt. Die Klonierung wurde trotz Mutation fortgeführt und eine SDM nach Ligation in den pMOWS-puro-Vektor geplant. Weiterführend wurde das IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 Fragment in den p409-Vektor eingebracht, um die cDNA des vollständigen Rezeptors zu erhalten (Abb. 23A). Dafür wurden pCR-Script-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (3915 bp) und p409-IL-23R (9766 bp) durch Zugabe von SnaBI linearisiert, anschließend gereinigt. Die linearisierten Plasmide wurden durch NotI enzymatisch gespalten und der somit entstandene Vektor p409 wurde zusätzlich dephosphoryliert. Der Vektor (8747 bp) und *insert* IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (1019 bp) wurden dann mittels Gelextraktion isoliert und zu p409-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (9766 bp) ligiert. Das Plasmid wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und eine *colony*-PCR mit FP hIL-23R-EcoRV-FP2 (DF366) und RP SOCS3-C-RP (DF822) durchgeführt. Die zu erwartende Fragmentlänge putativ positiver Klone betrug 1066 bp. Es folgte eine Plasmid-DNA-Isolation sowie Restriktionsspaltung mit HindIII, EcoRI, EcoRV und AflII+NotI und Sequenzierung des Plasmids (Abb. 23B). Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet. Die klonierte Rezeptorvariante p409-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 S482T wurde zudem hinsichtlich ihrer Expression in HEK293T Zellen überprüft (Abb. 23C). Neben des IL-23R trägt der Rezeptor einen myc-tag, weshalb sowohl bei Zugabe des Antikörpers α -IL-23R als auch bei α -myc ein deutliches Signal zu sehen ist. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt für IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 S482T: 71,56 kDa. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pEGFP verwendet.

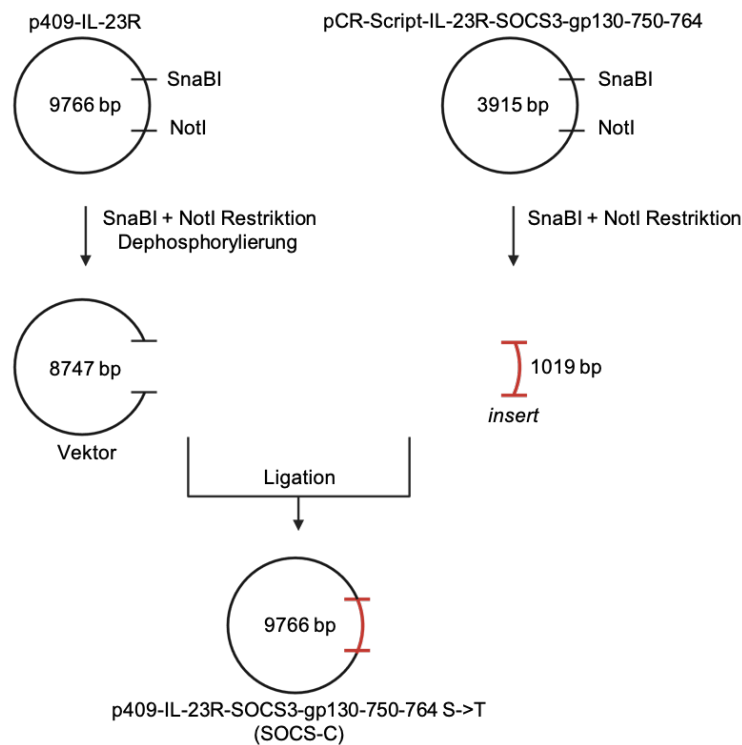
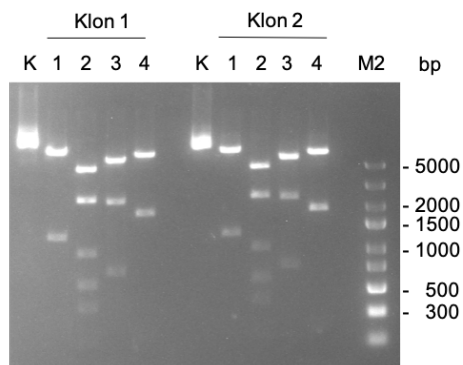
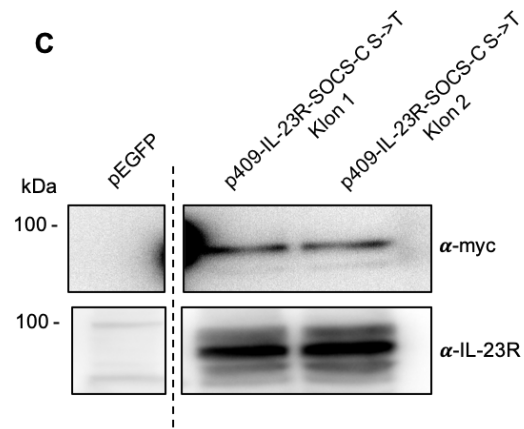
A**B****C**

Abb. 23: Klonierung der chimären Rezeptorvariante IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) S482T. (A) Schematische Übersicht der Klonierung von p409-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C). Die Ausgangsplasmide pCR-Script-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 sowie p409-IL-23R wurden zunächst mit SnaBI und NotI geschnitten. Die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Der p409-Vektor wurde weiterführend dephosphoryliert. Anschließend wurden *insert* und p409-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Nach Sequenzierung des klonierten Plasmids wurde eine Punktmutation S482T festgestellt. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von p409-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 S->T mit HindIII (1), EcoRI (2), EcoRV (3) und AflIII+NotI (4). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 8464 bp, 1302 bp; (2) 5150 bp, 2436 bp, 1008 bp, 615 bp, 402 bp, 155 bp; (3) 6638 bp, 2358 bp, 770 bp; (4) 7658 bp, 1903 bp, 205 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (9766 bp) sowie Marker M2 *GeneRuler™ Express ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen. (C). Zur Kontrolle der Rezeptorexpression wurden HEK293T-Zellen transient mit zwei Klonen des Plasmids transfiziert. Als Negativkontrolle wurde pEGFP verwendet. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern α -myc und α -IL-23R. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 S482T 71,56 kDa. Die dargestellten Banden stammen vom selben Blot. Nicht relevante Banden wurden aus der Abbildung entfernt und durch eine Trennlinie markiert. Eine Darstellung des vollständigen Gels findet sich in der ergänzenden Abbildung 9.

Um die Rezeptorvariante in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen etablieren zu können, wurde diese weiterführend in einen pMOWS-puro-Vektor kloniert (Abb. 24A). Der pMOWS-puro-Vektor (5782 bp) lag bereits geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor, das *insert* wurde durch präparative Spaltung von p409-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 mit PmeI generiert. Nach Reinigung des *inserts* (2055 bp) wurden *insert* und Vektor zu pMOWS-puro-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (7837 bp) ligiert und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die darauffolgende *colony*-PCR wurde mit FP hIL-23R-SnaBI-FP (DF479) und RP 3'pMOWS (DF86) durchgeführt, die erwartete Länge der DNA betrug dabei 1352 bp. Es erfolgte außerdem eine Plasmid-DNA-Isolation sowie Restriktionsspaltung mit HindIII, EcoRI und EcoRV (Abb. 24B). Eine Sequenzierung zur weiteren Kontrolle der DNA wurde veranlasst. Die Sequenzierung war nach Vergleich wie erwartet mit weiterhin bestehender Mutation S482T. Bereits nach der ersten Sequenzierung fiel auf, dass ein einzelner Basenaustausch S482T in der DNA des IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 Rezeptors stattgefunden hatte. Nach Klonierung in den pMOWS-puro-Vektor wurde deshalb eine SDM (siehe 2.2.11) mit FP HTG-HSG-P1 (DF826) und RP HTG-HSG-P2 (DF827) zur Rückmutation von S482T durchgeführt. Anschließend wurde das PCR Produkt gereinigt, mit DpnI enzymatisch gespalten und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Es folgte eine Plasmid-DNA-Mini-Präparation mit Kit und ein Restriktionsspaltung mit HindIII (Abb. 24C). Zusätzlich wurde eine Sequenzierung veranlasst, bei der die Rückmutation zu S482 bestätigt wurde.

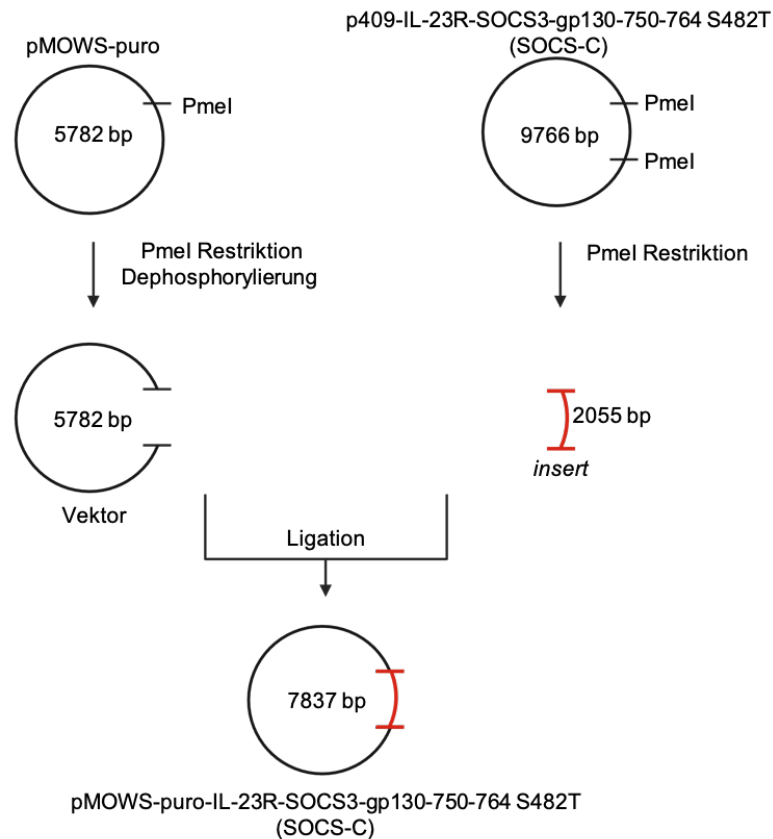
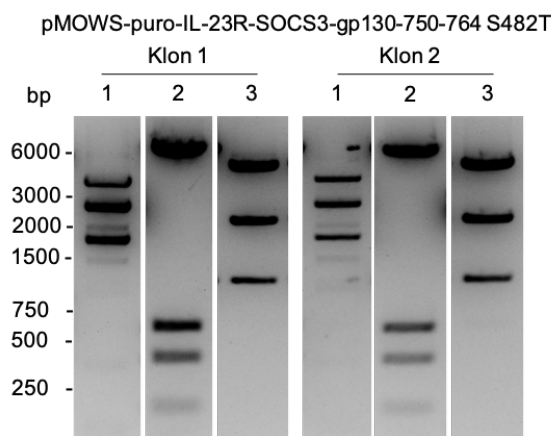
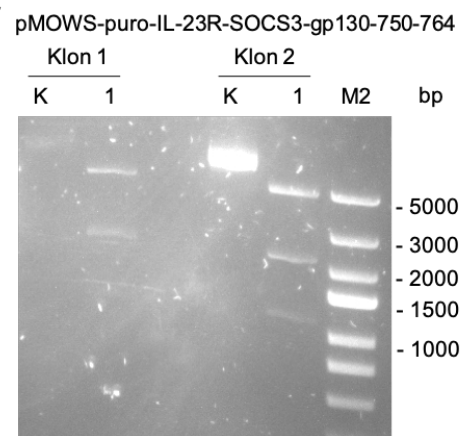
A**B****C**

Abb. 24: Klonierung von pMOWS-puro-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) S482T. (A) Schematische Übersicht der Klonierung von pMOWS-puro-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) S482T. Der pMOWS-puro-Vektor lag bereits mit PmeI geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Das Ausgangsplasmid p409-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 S482T wurde mit PmeI geschnitten, die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Anschließend wurden *insert* und pMOWS-puro-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von pMOWS-puro-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) S482T mit EcoRV (1), EcoRI (2) und HindIII (3). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 3589 bp, 2502 bp, 1671 bp, 75 bp; (2) 6590 bp, 615 bp, 402 bp, 155 bp, 41 bp, 34 bp und (3) 4768 bp, 2059 bp, 1010 bp. (C) Restriktionsspaltung nach Mini-Präparation von pMOWS-puro-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) mit HindIII (1). Die nach Sequenzierung festgestellte Mutation S482T wurde mittels SDM rückmutiert. Zwei Klone wurden analysiert. Erwarteten Fragmentgrößen: 4768 bp, 2059 bp, 1010 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (7837 bp) sowie Marker M2 *GeneRuler™ Express ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen.

3.2.2 Expression der Rezeptorvarianten in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien

Analog der IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten wurden die pMOWS-puro-IL-23R-SOCS Varianten (IL-23R-SOCS-A, IL-23R-SOCS-B, IL-23R-SOCS-C, IL-23R W395V, IL-23R-VV, IL-23R-VVV) für weiterführende Analysen stabil in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zelllinien transduziert. Die Rezeptorvariante IL-23R-SOCS-B wurde bereits im Rahmen der Dissertation von Franz Christian Horstmeier untersucht [136]. Nach Antibiotikaselektion mit Puromycin und Hygromycin B und Passage der Zellen über 2-3 Wochen wurde die Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 25). Auch hierbei wurde α -IL-12R β 1-PE zur Detektion des bereits etablierten Rezeptors IL-12R β 1 (Abb. 25A) sowie α -IL-23R zur Detektion der Rezeptorvarianten (Abb. 25B) eingesetzt. Ebenso dienten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression des IL-23R als Positivkontrolle, Ba/F3-gp130 Zellen (graue Kurve) als Negativkontrolle. Alle untersuchten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien zeigen entsprechend der Kurvenverschiebung im Histogramm eine Expression sowohl von IL-12R β 1 als auch von IL-23R bzw. den IL-23R-SOCS Varianten. Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-SOCS-A zeigten allerdings nur eine geringe Verschiebung bei der Detektion des IL-23R (Abb. 25B), weshalb die Durchflusszytometrie dieser Zelllinie und Detektion des IL-23R von PD Dr. Doreen M. Floss wiederholt und eine Expression der Rezeptorvariante bestätigt wurde (siehe ergänzende Abb. 8).

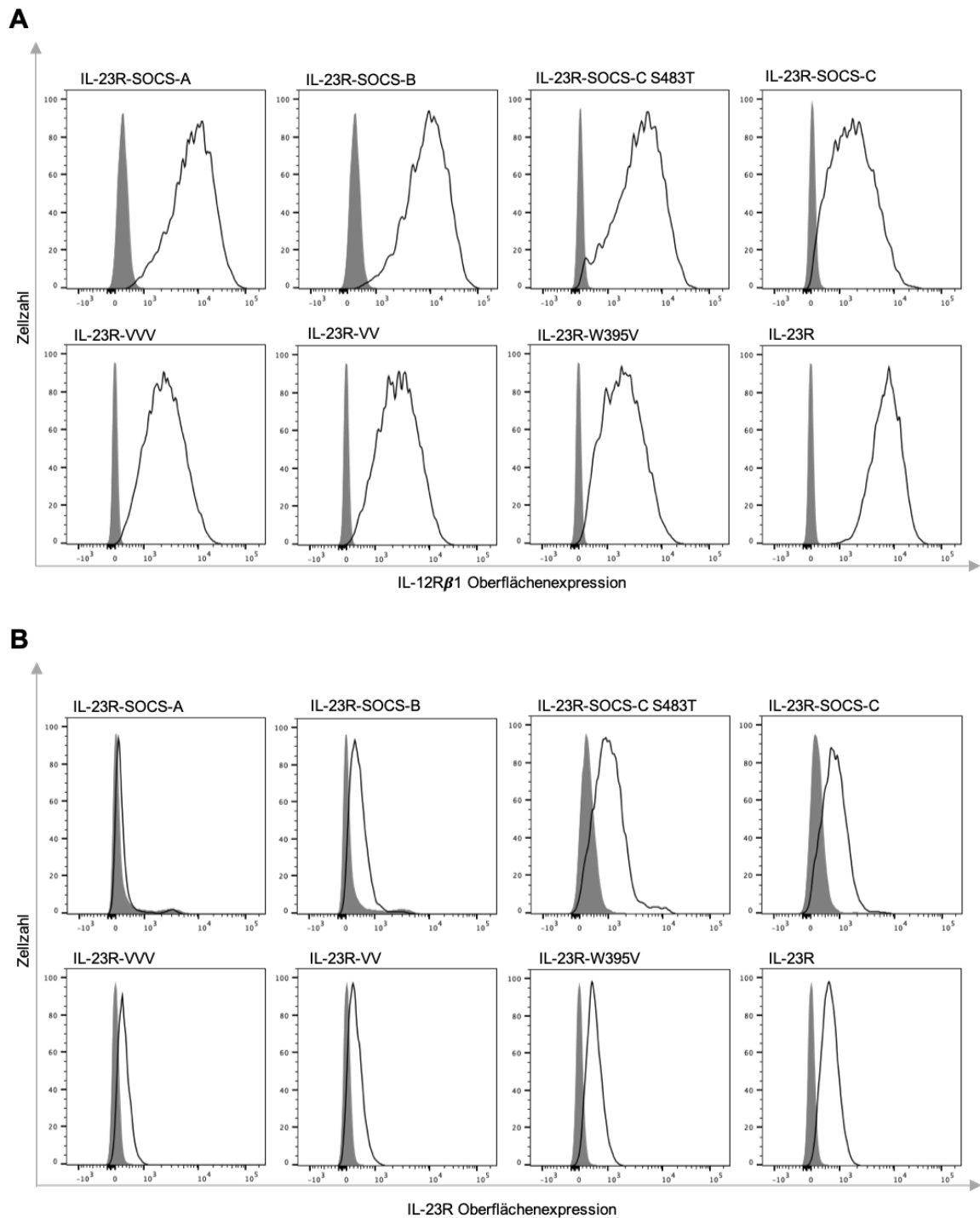


Abb. 25: Analyse der Oberflächenexpression von IL-23-SOCS-Rezeptorvarianten in stabilen Ba/F3-gp130-IL12R β 1 Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression der IL-23-SOCS-Rezeptorvarianten in stabilen Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen überprüft. Die Y-Achse der Histogramme zeigt die Zellanzahl, die X-Achse ist ein Maß für die Fluoreszenzintensität und zeigt somit die Oberflächenexpression des jeweiligen Rezeptors. **(A)** Detektion von IL-12R β 1. Die grau hinterlegte Kurve zeigt Ba/F3-gp130 Zellen (negative Kontrolle), das weiße Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression von IL-12R β 1. Als Antikörper wurde α -IL-12R β 1-PE verwendet. **(B)** Detektion der IL-23R Expression mittels α -IL-23R-bio und sekundärer Zugabe von Streptavidin-APC. Ba/F3-gp130 Zellen (graue Kurve) wurden als Negativkontrolle, Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen als Positivkontrolle verwendet. Das weiße Histogramm zeigt Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit IL-23-Rezeptorvarianten.

Darüber hinaus wurden die Zellen mit Expression der IL-23R-SOCS Varianten hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens und intrazellulärer Signaltransduktion analysiert (Abb. 26), wobei Zellen mit Expression des IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C) im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Die Analysen der SOCS-C Rezeptorvariante sowie die kinetischen Untersuchungen der IL-23R-SOCS Varianten analog der kinetischen Untersuchungen der IL-23R-gp130 Varianten wurden folgend in der Dissertation von Leonina Kashtanjeva durchgeführt. Die Daten sind inzwischen teils veröffentlicht [145].

Der Versuchsaufbau der Proliferations- und Signaltransduktionsanalyse war identisch mit der Analyse der IL-23R-gp130 Varianten. Gleichmaßen wurde eine fehlende Proliferation der Zelllinie Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R bei Stimulation mit 1 μ g/ml HIL-23 beobachtet (Abb. 26A). Ausgehend von dieser Beobachtung ist auffällig, dass die Veränderung einer Aminosäure (W395V) keinen Unterschied, die Veränderung zweier Aminosäuren (I400V, P401V) dagegen einen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten auslöst. Ba/F3-Zellen mit IL-23R-VV bzw. IL-23R-VVV proliferieren im Gegensatz zum WT kaum bei Stimulation mit 10 ng/ml HIL-23, dafür jedoch bei Stimulation mit 1 μ g/ml HIL-23. In Zellen mit der IL-23R-SOCS-A Variante gab es sogar gar keine Proliferation nach Stimulation mit HIL-23. Auch das Proliferationsverhalten der Zellen mit Expression von IL-23R-SOCS-B ist offensichtlich anders als bei Zellen mit Expression des WT. Die Zellen proliferieren bei Stimulation sowohl mit 10 ng/ml als auch mit 1 μ g/ml HIL-23, wobei 1 μ g/ml eine stärkere Proliferation auslöst.

Mit Ausnahme von BaF3/gp130-IL-12R β 1-IL-23R-SOCS-A zeigt sich in allen Zelllinien eine STAT3 Aktivierung sehr deutlich bei 1 μ g/ml HIL-23 (Abb. 26B). Die STAT3 Aktivierung nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-23 scheint in allen Zelllinien etwas geringer zu sein. Analog ihres Proliferationsverhaltens zeigen Zellen mit Expression von IL-23R-SOCS-A keinerlei STAT3 Aktivität. Das Experiment wurde im Rahmen dieser Arbeit nur einmal wiederholt und muss daher noch unabhängig dessen bestätigt werden.

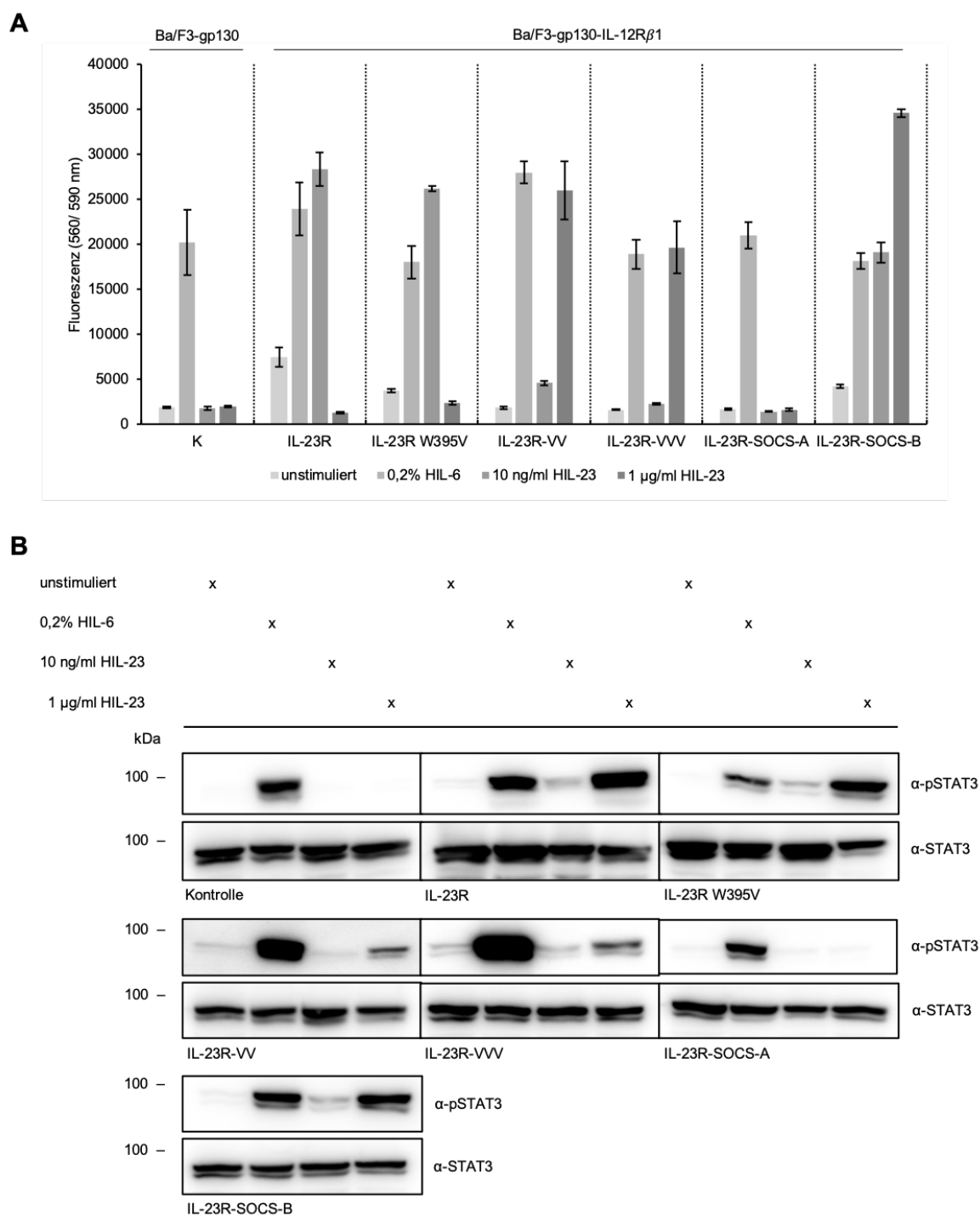


Abb. 26: Analyse des Proliferationsverhaltens und der STAT3 Aktivierung stabiler Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit IL-23-SOCS Rezeptorvarianten. (A) Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit Expression der IL-23-SOCS Rezeptorvarianten wurden hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht. Als Negativkontrolle K wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 72 h ohne Zytokin (weiß), mit 0,2 % HIL-6 (hellgrau), 10 ng/ml HIL-23 (grau) und 1 μ g/ml HIL-23 (dunkelgrau) kultiviert, bevor die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] am Fluorometer gemessen wurde. n=3 **(B)** Analyse der STAT3 Aktivierung in stabilen Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit Expression der IL-23-SOCS Rezeptorvarianten in unterschiedlichen Konditionen. Ba/F3-gp130 Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Zellen wurden 30 min stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Zur Detektion wurden die Antikörper α -STAT3 und α -pSTAT3 eingesetzt. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für STAT3 und pSTAT3 80 kDa. n=1

3.3 Alternative IL-12R β 1 Rezeptorvariante mit SOCS3-Motiv

In weiteren Überlegungen, wie eine SOCS3 Suppression im IL-23 Signalweg induziert werden könnte, wurde der Fokus auf den humanen IL-12R β 1 gerichtet. Dieser Rezeptor ist neben dem IL-23R in der Signalübertragung von IL-23 essenziell, besitzt jedoch außer der Box-Motive zur Assoziation mit TYK2 keine intrazellulären Tyrosine zur Interaktion mit Signalproteinen. Dementsprechend wird hierüber weder eine kanonische STAT3 Aktivierung noch eine SOCS3 Hemmung vermittelt. Fraglich war also, ob eine SOCS3 Interaktion und Hemmung der STAT3 Aktivierung durch Generierung einer chimären IL-12R β 1-gp130 Rezeptorvariante möglich sei. Hierfür wurde der intrazelluläre Anteil ab Aminosäure 640 des humanen IL-12R β 1 durch K709-Q813 des gp130 ersetzt (Abb. 27). Für weiterführende Stimulations- und Proliferationsanalysen wurde der Rezeptor nach der Klonierung stabil in Ba/F3-gp130 Zelllinien etabliert.

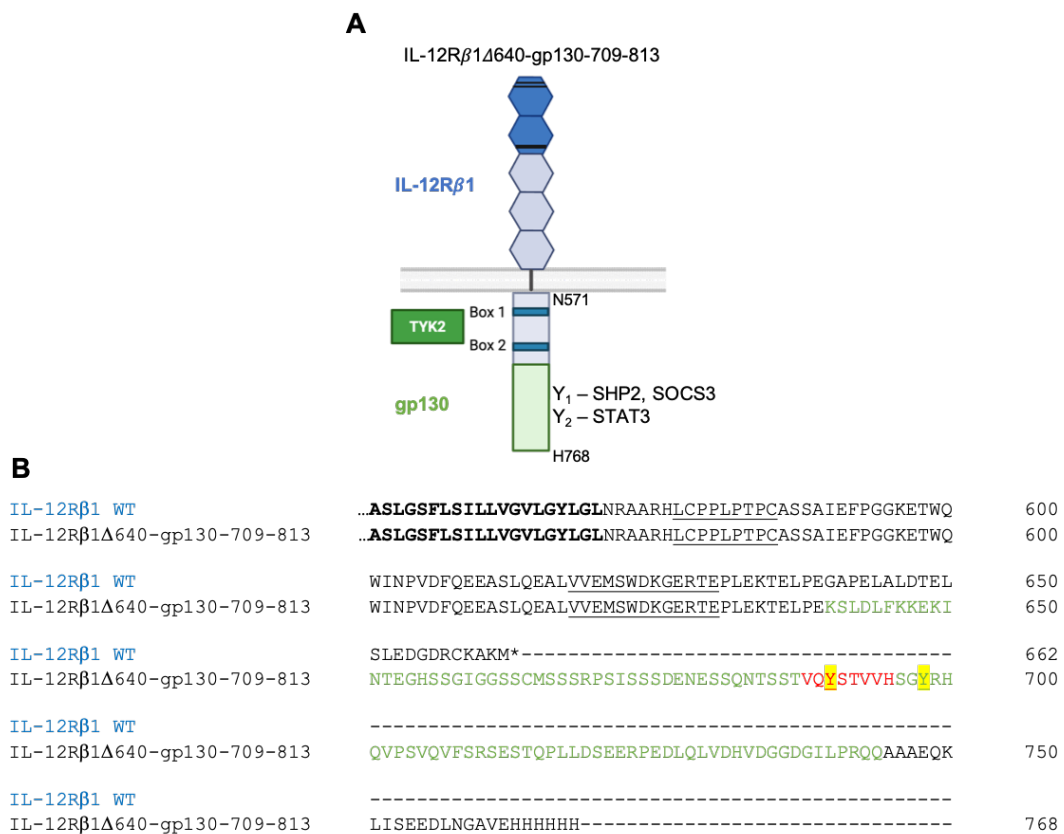


Abb. 27: Schematische Übersicht des IL-12R β 1Δ640-gp130-709-813. (A) Schematische Übersicht des chimären Rezeptors. Anteile des IL-12R β 1 sind in blau, des gp130 in grün dargestellt. Über die Box 1 und Box 2 interagiert TYK2 mit IL-12R β 1. Innerhalb der gp130-Domäne finden sich zwei Tyrosine (Y), die zur Signaltransduktion essenziell sind. Beginn und Ende der ICD sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. **(B)** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen des IL-12R β 1 Wildtyp sowie der Rezeptorvariante IL-12R β 1Δ640-gp130-709-813. Dick markiert ist die Transmembrandomäne, die Punkte davor zeigen weitere nicht dargestellte Aminosäuren an. Box 1 und Box 2 sind unterstrichen, der Anteil des gp130 Rezeptors (K709-Q813) ist grün und das SOCS3 Bindemotiv rot markiert. Intrazelluläre Tyrosine sind gelb hinterlegt.

3.3.1 Klonierung des IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 Expressionsvektors

Analog zur Klonierung der anderen Rezeptorvarianten wurde zunächst ein pCR-Script Plasmid kloniert. Als *template* (A) diente dabei p409-IL-12R β 1 (Doreen M. Floss), als *template* (B) p409-IL23R-gp130-642-813. Für die PCR von (A) wurde FP hIL-12R β 1-Esp3I-F (DF796) und RP 12R β 1-gp130-Q813-SOE-RP (DF825), für (B) wurde FP 12R β 1-gp130-Q813-SOE-FP (DF824) und RP gp130-Q813-Not-RP (DF823) eingesetzt. Nach Gelextraktion und Kontrolle der entstandenen Fragmente (A) (583 bp) und (B) (341 bp) im Agarosegel erfolgte die Fusion von (A) und (B) zu IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 (897 bp). Für die Fusions-PCR wurden FP hIL12R β 1-Esp3I-F (DF796) und RP gp130-Q813-Not-RP (DF823) verwendet. Anschließend wurde das PCR-Produkt phosphoryliert, im Agarosegel analysiert und isoliert und in den pCR-Script Vektor ligiert. Dieser lag bereits in der AG Scheller vor. Der Transformation in kompetente *E. coli* Zellen folgte eine *colony*-PCR mit FP pCR-Script fwd1 (DF38) und RP pCR-Script rev1 (DF39), wobei die erwartete Fragmentlänge putativ positiver Kolonien 1139 bp betrug. Zur weiteren Kontrolle wurde nach Isolation der Plasmid-DNA ein Restriktionsspaltung mit XhoI + NotI (340 bp, 3427 bp) sowie eine Sequenzierung durchgeführt. Sie Sequenz war nach Vergleich wie erwartet.

Für die Expression des chimären IL-12R β 1 erfolgte der Transfer in den p409-IL-12R β 1 Vektor (Abb. 28A). Zunächst wurden Vektor p409-IL-12R β 1 (9865 bp) und pCR-Script-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 (3767 bp) mittels NotI linearisiert, gereinigt und anschließend mit Esp3I präparativ gespalten. Zusätzlich wurde der p409-Vektor dephosphoryliert. Das somit generierte *insert* (875 bp) und der Vektor (9236 bp) wurden im Agarosegel analysiert, extrahiert und miteinander ligiert. Das ligierte Plasmid p409-IL12-R β 1 Δ 640-gp130-709-813 (10111 bp) wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert, anschließend fand eine *colony*-PCR mit FP hIL12R β 1-FP3 (DF352) und RP c-myc-pR1 (DF46) zur Detektion positiver Klone (Fragmentlänge 1107 bp) statt. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurde eine Restriktionsspaltung mit HindIII, EcoRI, EcoRV und AflII + NotI zur Kontrolle des Plasmids durchgeführt (Abb. 28B).

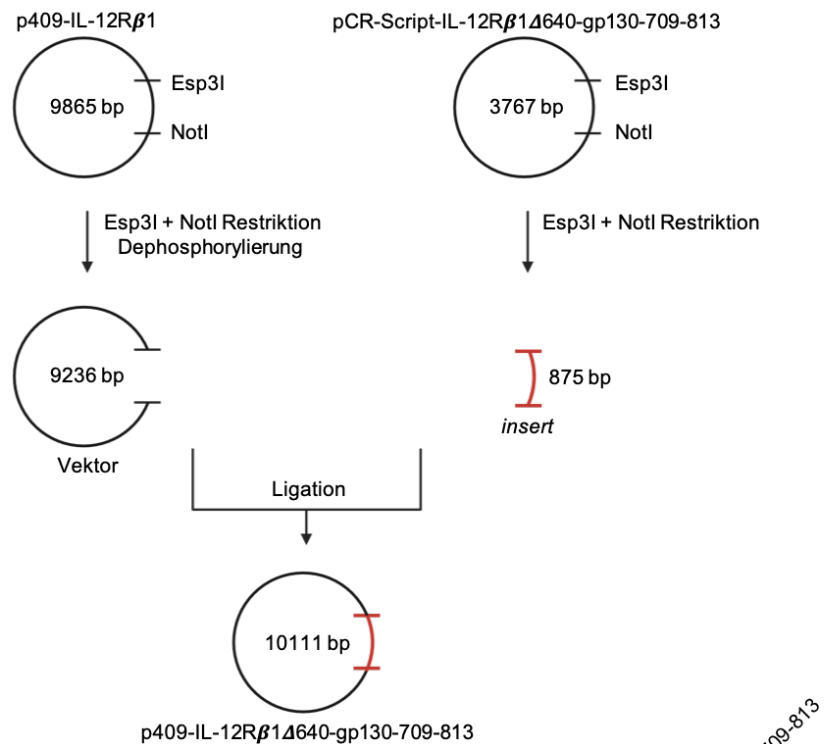
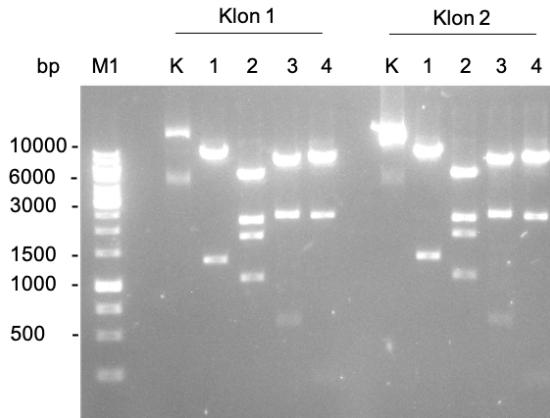
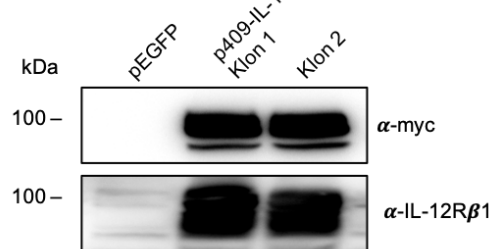
A**B****C**

Abb. 28: Klonierung der chimären Rezeptorvariante IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813. (A) Schematische Übersicht der Klonierung. Die Ausgangsplasmide p409-IL-12R β 1 sowie pCR-Script-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 wurden zunächst mit NotI und Esp3I geschnitten. Die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Der p409-Vektor wurde weiterführend dephosphoryliert. Anschließend wurden *insert* und p409-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Isolation von p409-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 mit HindIII (1), EcoRI (2), EcoRV (3) und AflIII+NotI (4). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 8809 bp, 1302 bp; (2) 5150 bp, 2214 bp, 1739 bp, 1008 bp; (3) 7186 bp, 2358 bp, 567 bp, (4) 7658 bp, 2248 bp, 205 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (10111 bp) sowie Marker M1 *GeneRuler™ 1kb DNA ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen. (C) Testexpression zweier Klone von p409-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 in HEK293T Zellen. Nach Transformation und Inkubation der Zellen für 48 h folgte die Lyse der Zellen, Western Blot und Detektion durch Zugabe von α -myc sowie α -IL-12R β 1. Als Negativkontrolle wurde pEGFP verwendet. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 82,16 kDa. Nicht relevante Banden wurden aus der Abbildung entfernt. Eine Darstellung des vollständigen Gels findet sich in der ergänzenden Abbildung 10.

Weiterhin wurde die klonierte Rezeptorvariante hinsichtlich ihrer Expression in HEK293T-Zellen überprüft (Abb. 28C). Neben zwei Klonen des Plasmids wurde als Negativkontrolle pEGFP transfiziert. Die Analyse erfolgte analog der zuvor klonierten Rezeptorvarianten mittels Western Blot und anschließender Zugabe der Antikörper α -myc sowie α -IL-12R β 1. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt für IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 82,16 kDa. Mit Ausnahme von pEGFP ist bei beiden Klonen des Plasmids eine deutliche Bande für das Vorhandensein des chimären Rezeptors zu erkennen.

3.3.2 Erzeugung stabiler Ba/F3-Zelllinien mit dem chimären IL-12R β 1

Nach Generierung der p409-Plasmide und deren erfolgreichen Expression nach transienter Transfektion in HEK293T-Zellen wurde die Rezeptorvariante weiterführend in pMOWS-hygro kloniert (Abb. 29A). Der pMOWS-hygro-Vektor lag bereits geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Die cDNA des Rezeptors musste dagegen zunächst aus dem p409-Expressionsvektor isoliert werden. Hierfür wurde eine präparative Spaltung mit PmeI und eine Gelextraktion nach Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Länge der isolierten DNA betrug dabei 2400 bp. Anschließend wurden Vektor und *insert* ligiert (8549 bp), in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und eine *colony*-PCR mit FP hIL12R β 1-FP3 (DF352) und RP 3'pMOWS (DF86) veranlasst. Putativ positive Kolonien wiesen eine Fragmentlänge von 1342 bp auf. Zudem wurde eine Plasmid-DNA-Isolation und Restriktionsspaltung mit HindIII, EcoRI und EcoRV durchgeführt (Abb. 29B).

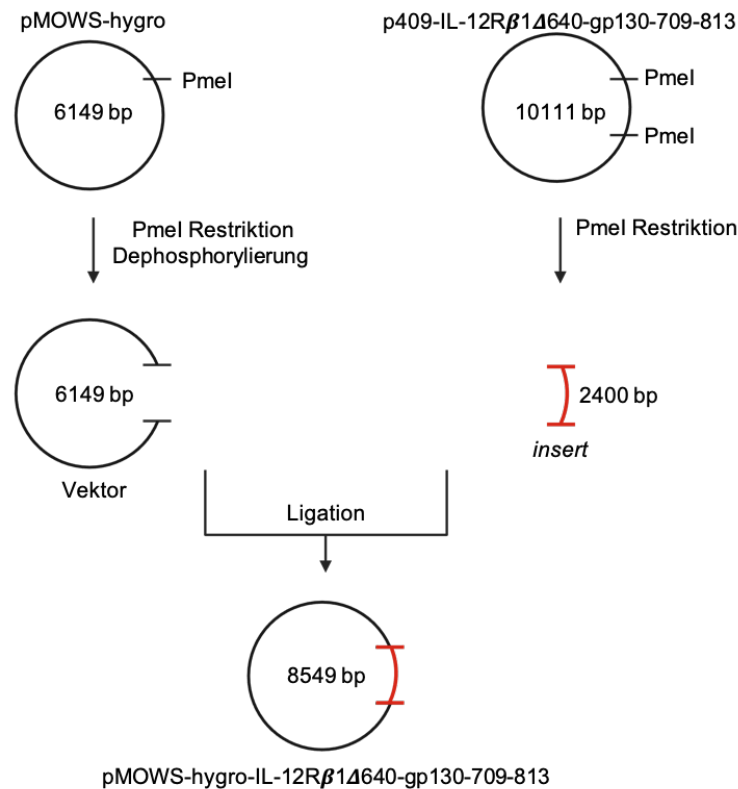
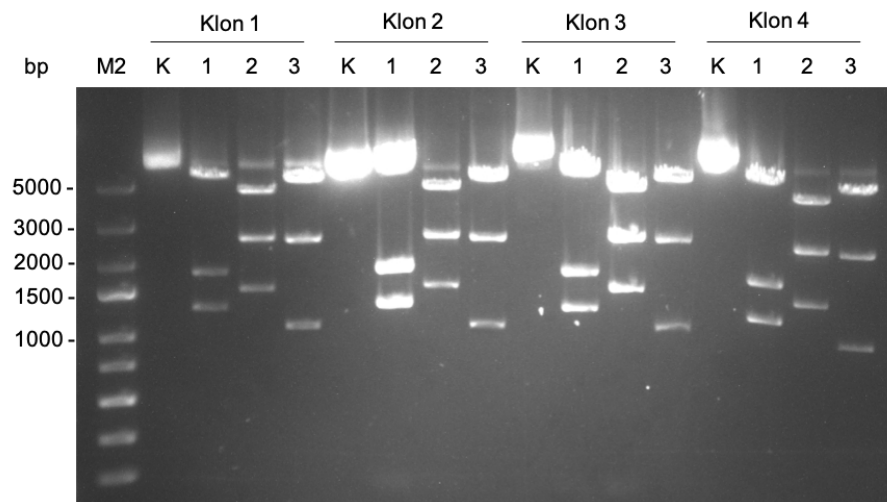
A**B**

Abb. 29: Klonierung von pMOWS-hygro-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813. (A) Schematische Übersicht der Klonierung von pMOWS-hygro-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813. Der pMOWS-hygro-Vektor lag bereits mit PmeI geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Das Ausgangsplasmid p409-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 wurde mit PmeI geschnitten, die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Anschließend wurden *insert* und pMOWS-hygro-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von pMOWS-hygro-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 mit EcoRI (1), EcoRV (2) und HindIII (3). Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 5516 bp, 1739 bp, 1219 bp, 41 bp, 34 bp; (2) 4504 bp, 2502 bp, 1468 bp, 75 bp; (3) 5135 bp, 2404 bp, 1010 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (8549 bp) sowie Marker M2 *GeneRulerTM Express DNA ladder* aufgetragen.

Für weiterführende Analysen musste die Rezeptorvariante stabil in Ba/F3-Zelllinien eingebracht werden. Hierfür wurde pMOWS-hygro-IL12R β 1 Δ 640-gp130-709-813 in Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL-23R und Ba/F3-gp130-IL-12R β 2 Zellen retroviral transduziert. Ba/F3-gp130 Zelllinien mit Expression des IL-23R und IL-12R β 2 wurden bereits vorher in der AG Scheller generiert und stetig passagiert. Nach Transduktion und Antibiotikaselektion mit Hygromycin B und Puromycin über 2-3 Wochen wurde die Rezeptorexpression in den transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 30). Zur Detektion der Rezeptorvariante wurde der Antikörper α -IL-12R β 1-PE, zur Detektion der bereits etablierten Rezeptoren α -IL-23R-bio und α -IL-12R β 2 eingesetzt. Die grau hinterlegte Kurve repräsentiert die Negativkontrolle Ba/F3-gp130. Zusätzlich wurde je nach eingesetztem Antikörper eine Ba/F3-gp130 Zelllinie mit etabliertem Rezeptor (IL-12R β 1, IL-23R oder IL-12R β 2) als positiver Vergleich herangezogen. Eine Verschiebung des weißen Histogramms nach rechts ausgehend von der Negativkontrolle bedeutet eine Expression des zu detektierenden Rezeptors. Entsprechend zeigen alle hier untersuchten Zelllinien eine Expression der Rezeptorvariante IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813. Weiterführende Analysen mit diesen Zelllinien wurden im Rahmen ihrer Dissertation von Leorina Kashtanjeva durchgeführt (Daten noch nicht veröffentlicht).

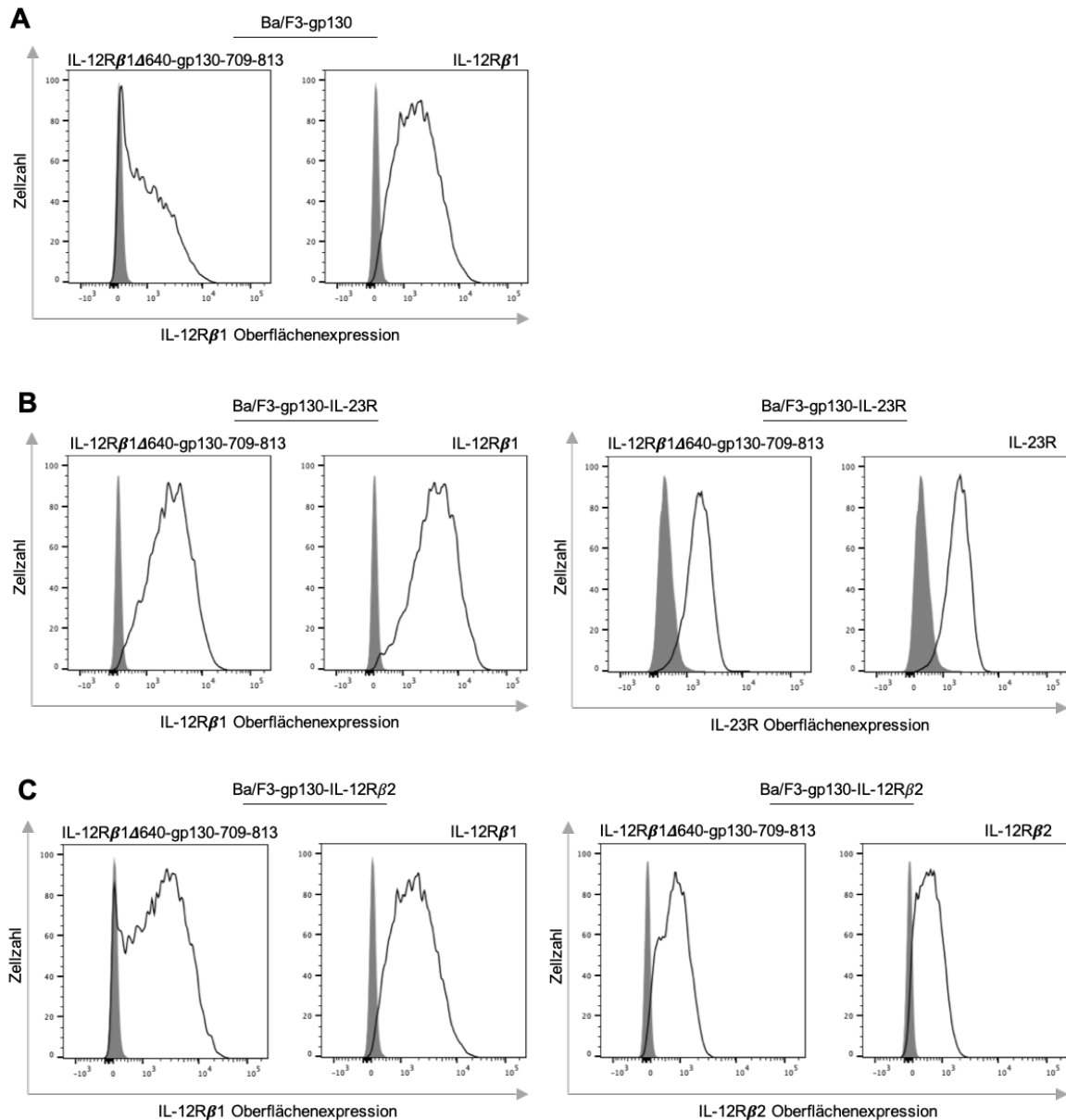


Abb. 30: Analyse der Oberflächenexpression von IL-12R β 1 Δ 640-709-813 in verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von IL-12R β 1 Δ 640-709-813 in unterschiedlichen Ba/F3-gp130 Zelllinien überprüft. **(A)** Detektion von IL-12R β 1 in Ba/F3-gp130 Zellen durch Zugabe von α -IL-12R β 1-PE. Die grau hinterlegte Kurve zeigt Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle), die weiße Kurve zeigt Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression von IL-12R β 1 (Positivkontrolle) bzw. IL-12R β 1 Δ 640-709-813. **(B)** Detektion von IL-12R β 1 und IL-23R in Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen durch Zugabe von α -IL-12R β 1-PE bzw. α -IL-23R. Die grau hinterlegte Kurve zeigt Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle), die weiße Kurve zeigt Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen mit Expression von IL-12R β 1 bzw. IL-23R (Positivkontrolle) und IL-12R β 1 Δ 640-709-813. **(C)** Detektion von IL-12R β 1 und IL-12R β 2 in Ba/F3-gp130-IL-12R β 2 Zellen durch Zugabe von α -IL-12R β 1-PE bzw. α -IL-12R β 2. Die grau hinterlegte Kurve zeigt Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle), die weiße Kurve zeigt Ba/F3-gp130-IL-12R β 2 Zellen mit Expression von IL-12R β 1 bzw. IL-12R β 2 (Positivkontrolle) und IL-12R β 1 Δ 640-709-813.

3.4 Klonierung von p409-SOCS3 Δ PEST-FLAG-HA-myc

Um zu untersuchen, welche Auswirkung eine Transfektion von SOCS3 auf die Aktivität von STAT3 in Stimulationsanalysen mit HEK293T- und U4C-Zellkulturen hat, wurde SOCS3 in den Expressionsvektor p409 kloniert. Dabei lag das Plasmid p409-SOCS3 Δ PEST-HA-myc bereits in der AG Scheller vor. Die Deletion des „PEST“-Motivs innerhalb der SH2-Domäne von SOCS3 erhöht die Stabilität von SOCS3 und verlangsamt somit den SOCS3 Abbau [20]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben den bereits bestehenden HA- und myc-tags an SOCS3 zusätzlich ein FLAG-tag eingefügt werden (Abb. 31). Hierfür wurde das bestehende Plasmid (8508 bp) zunächst mit NotI linearisiert, die entstandenen Enden dephosphoryliert, im Agarosegel analysiert und per Gelextraktion gereinigt. Zur Insertion der codierenden Sequenz für den FLAG-tag wurden die Linker mp19-FLAG-L1 (DF737) und mp19-FLAG-L2 (DF738) phosphoryliert und miteinander verbunden. Anschließend erfolgte die Ligation von Vektor und Linker-DNA zu p409-SOCS3 Δ PEST-FLAG-HA-myc (8541 bp) sowie Transformation des Plasmids in kompetente *E. coli* Zellen. Zur Detektion putativ positiver Klone (Fragmentlänge 184 bp) wurde eine *colony*-PCR mit FP FLAG-FP (DF748) und RP pcDNA3.1fwd (DF16) durchgeführt. Nach Isolation der Plasmid-DNA sowie Restriktionsspaltung mit EcoRI (5150 bp, 3391 bp) (Abb. 31B), wurde das Plasmid zur vollständigen Kontrolle sequenziert. Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet.

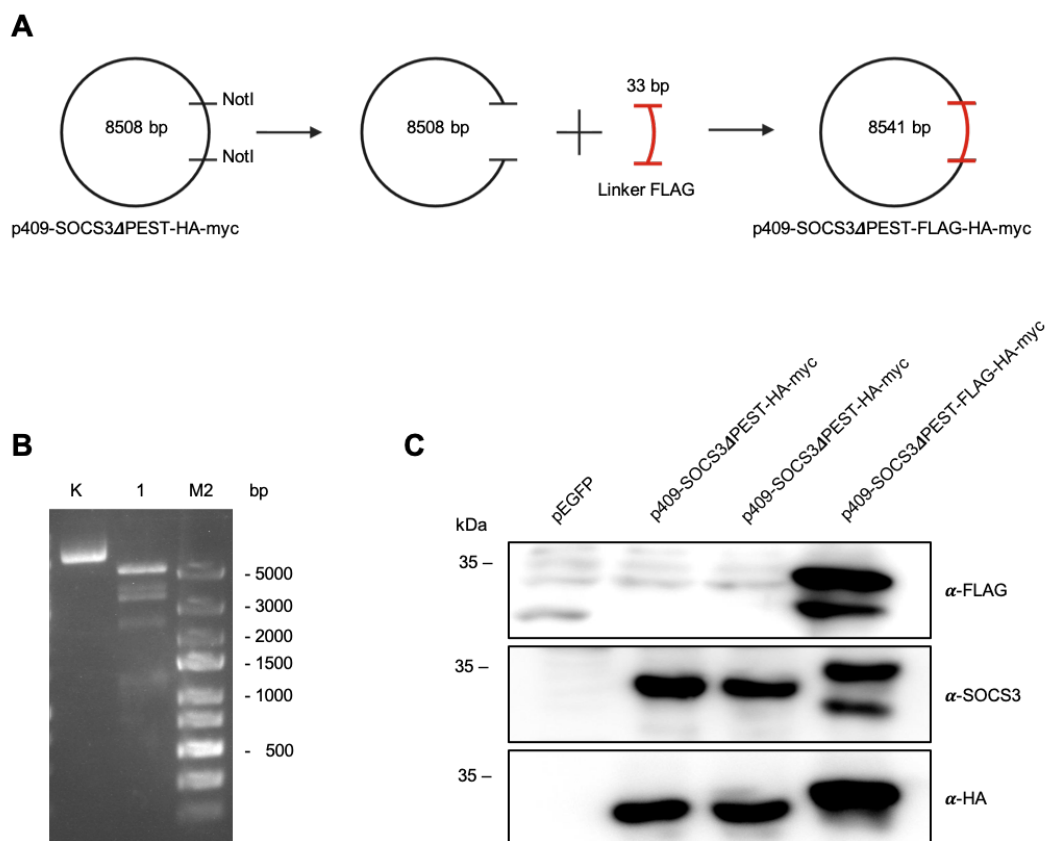


Abb. 31: Klonierung des Expressionsvektors p409-SOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc. (A) Schematische Übersicht der Klonierung. Das Ausgangsplasmid p409-SOCS3ΔPEST-HA-myc wurde mit NotI geschnitten, die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Anschließend wurden FLAG-Linker (rot markiert) und das linearisierte Plasmid ligiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von p409-hSOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc mit EcoRI (1). Erwartete Fragmentgrößen: 5150 bp, 3391 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (8541 bp) und Marker M2 *GeneRuler™ Express DNA Ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen. (C) Testexpression der Plasmide p409-hSOCS3ΔPEST-HA-myc (2 Klone) und p409-hSOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc in HEK293T Zellen. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden sowie pEGFP (Negativkontrolle) transfiziert, nach 48 h lysiert und mittels Western Blot analysiert. Die Antikörper α-FLAG, α-SOCS3 (Testexpression) sowie α-HA wurden zur Detektion verwendet. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für SOCS3ΔPEST-HA-myc 26,93 kDa, für SOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc 28,14 kDa.

Um die Expression des FLAG-Proteins zu überprüfen, wurde das Plasmid, sowie das ursprüngliche Plasmid p409-SOCS3ΔPEST-HA-myc und pEGFP (Negativkontrolle) transient in HEK293T-Zellen transfiziert und eine Western Blot Analyse durchgeführt (Abb. 31C). Die Detektion erfolgte durch Zugabe der Antikörper α-FLAG, α-SOCS3 und α-HA. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt für SOCS3ΔPEST-HA-myc 26,93 kDa, für SOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc 28,14 kDa. Ein FLAG-tag ist nur bei Transfektion des neu generierten Plasmids p409-hSOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc zu erkennen.

3.5 Erzeugung eines konstitutiv-aktiven IL-23 Rezeptors

Eine Homodimerisierung und konstitutive Aktivität des IL-23R konnte bei Deletion der *stalk region* sowie Deletion der gesamten ECD nachgewiesen werden [74]. Dagegen ist bereits eine Insertion der AS-Sequenz „PPCL“ in der TMD des IL-7R α für eine konstitutive Aktivität dieses Rezeptors ausreichend und kann für therapeutische Zwecke genutzt werden [131-133]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob ein Austausch der TMD des IL-23R mit der TMD des IL-7R α einschließlich der „PPCL“ Insertion, auch eine konstitutive Aktivität des IL-23R auslöst.

3.5.1 Klonierung des Expressionsvektors p409-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL

Zur Generierung des pCR-Script Plasmids wurde zunächst eine PCR mit *template* (A) p409-IL-23R, FP hIL-23R-SnaBI (DF479) und RP hIL-23R-hIL7RTM-RP (DF816) sowie mit *template* (B) pcDNA3.1-GFP-VHH-IL7R-ECD-TMD(PPCL)-hIL23R-ICD (Meryem Ouzin), FP hIL23R-hIL7RTM-FP (DF815) und RP hIL-23R-Not rev (DF155) durchgeführt. Die Fragmente (A) (210 bp) und (B) (869 bp) wurden nach Agarosegelelektrophorese mittels Gelextraktion gereinigt und in einer Fusions-PCR mit FP hIL-23R-SnaBI (DF479) und RP hIL-23R-Not rev (DF155) zu IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL (1057 bp) verbunden. Nach Phosphorylierung und erneuter Gelextraktion erfolgte die Ligation in pCR-Script. Der pCR-Script Vektor lag bereits in der AG Scheller vor. Das Plasmid (3928 bp) wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert, woraufhin eine *colony*-PCR mit FP pCR-Script fwd1 (DF38) und RP pCR-Script rev1 (DF39) folgte. Die erwartete Fragmentlänge bei positiven Kolonien betrug 1300 bp. Weiterhin fand eine Plasmid-DNA-Isolation und Restriktionsspaltung mit EcoRI (630 bp, 3298 bp) sowie Sequenzierung statt. Die Sequenz war nach Vergleich wie erwartet. Nach Sequenzierung wurde das Plasmid durch Zugabe von SnaBI linearisiert, gereinigt und mit NotI präparativ gespalten (Abb. 32A). Das somit entstandene *insert* IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL (1034 bp) wurde in einer Gelextraktion erneut gereinigt und in einen p409-IL-23R-Vektor ligiert. Der Vektor lag bereits geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Nach Transformation des Plasmids (9781 bp) in kompetente *E. coli* Zellen erfolgte eine *colony*-PCR mit FP hIL23R-EcoRV-FP2 (DF366) und RP hIL23R-hIL7RTM-RP (DF816), wobei die erwartete Fragmentlänge 706 bp betrug. Anschließend wurde eine Plasmid-DNA-Isolation sowie Restriktionsspaltung mit EcoRI, EcoRV und AflII + NotI durchgeführt (Abb. 32B).

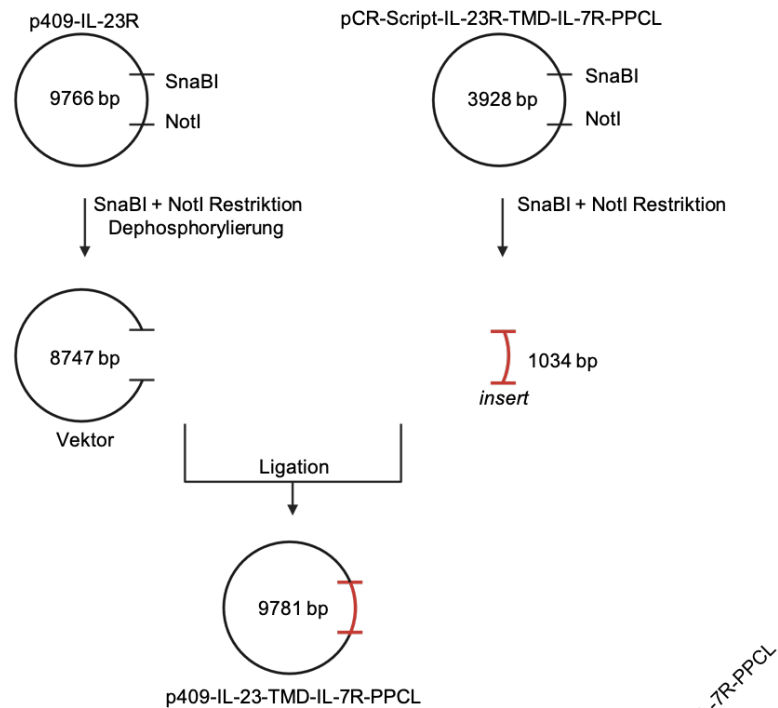
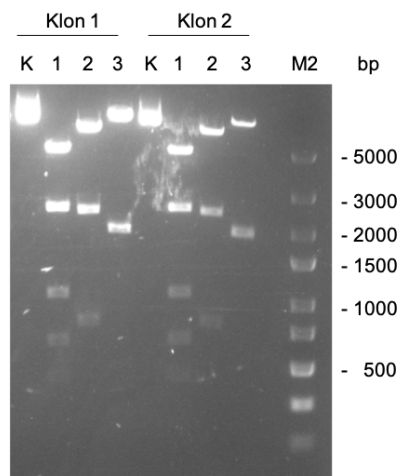
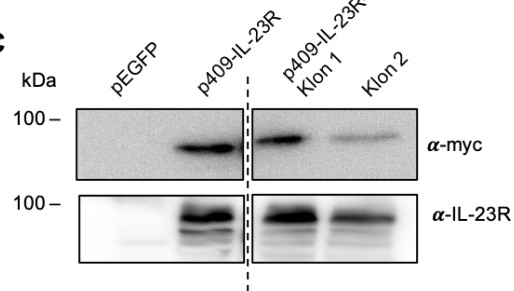
A**B****C**

Abb. 32: Klonierung der konstitutiv aktiven Rezeptorvariante IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. (A) Schematische Übersicht der Klonierung. Die Ausgangsplasmide wurden zunächst mit SnaBI und NotI geschnitten, die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Der p409-Vektor wurde weiterführend dephosphoryliert. Anschließend wurden *insert* und Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. **(B)** Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von p409-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL mit EcoRI (1), EcoRV (2) und AflII+NotI (3). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 5150 bp, 2436 bp, 1008 bp, 630 bp, 402 bp, 155 bp; (2) 6653 bp, 2358 bp, 770 bp und (3) 7635 bp, 1941 bp, 205 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (9781 bp) sowie Marker M2 *GeneRuler™ Express DNA Ladder* zum Vergleich der Fragmentgrößen aufgetragen. **(C)** Testexpression der zwei Klone in HEK293T Zellen. Als Negativkontrolle wurde pEGFP verwendet. Nach Transformation und Inkubation der Zellen für 48 h wurden die Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern α-myc und α-IL-23R. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) beträgt für IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL 72,31 kDa, für IL-23R 71,71 kDa. Die dargestellten Banden stammen vom selben Blot. Nicht relevante Banden wurden aus der Abbildung entfernt und durch eine Trennlinie markiert. Eine Darstellung des vollständigen Gels findet sich in der ergänzenden Abbildung 11.

Die Expression des IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL wurde durch Transformation zweier Klone in HEK293T Zellen und anschließendem Western Blot überprüft (Abb. 32C). Die Detektion des chimären Rezeptors erfolgte durch Zugabe der Antikörper α -IL-23R und α -myc, da die Rezeptoren einen myc-tag tragen. Als Negativkontrolle diente pEGFP, als Positivkontrolle der IL-23R WT. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt für IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL 72,31 kDa und für IL-23R 71,71 kDa. Ein deutliches Signal ist mit Ausnahme von pEGFP für die IL-23R-Varianten zu erkennen.

Nach Generierung des Expressionsvektors und dessen erfolgreicher Expression in HEK293T Zellen wurde die cDNA kodierend für den chimären Rezeptor weiterführend in den pMOWS-puro-Vektor für die Erzeugung von stabilen Ba/F3-Zelllinien, kloniert (Abb. 33A). Dieser lag bereits geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Das *insert* IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL (2070 bp) wurde nach präparativer Spaltung des Expressionsvektors durch Zugabe von PmeI, Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion isoliert und mit dem Vektor ligiert. Anschließend erfolgte eine Transformation des entstandenen Plasmids pMOWS-puro-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL (7852 bp) in kompetente *E. coli* Zellen sowie eine *colony*-PCR mit FP hIL23R-SnaBI-FP (DF479) und RP 3'pMOWS (DF86). Die erwartete Fragmentlänge putativ positiver Kolonien betrug dabei 1367 bp. Weiterführend wurde eine Plasmid-DNA-Isolation und Restriktionsspaltung mit HindIII, EcoRI und EcoRV durchgeführt (Abb. 33B).

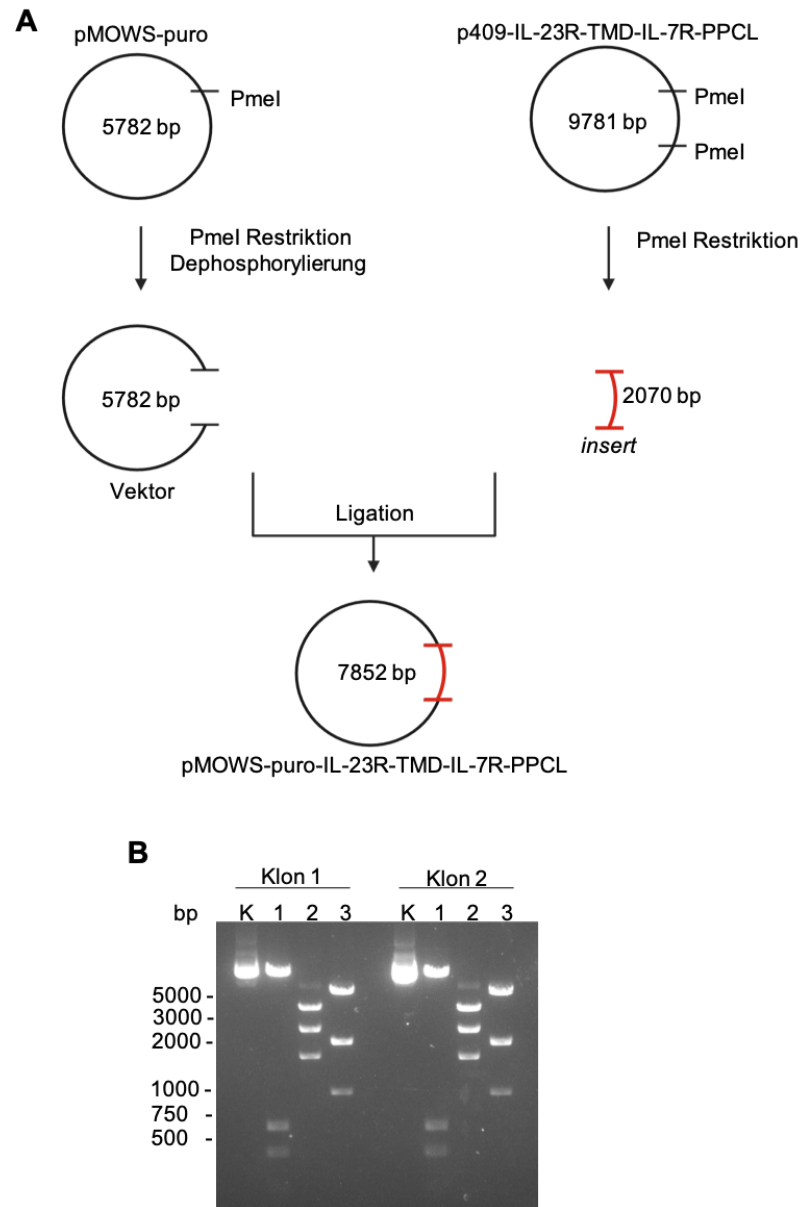


Abb. 33: Klonierung der konstitutiv aktiven Rezeptorvariante IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL in den retro-viralen Vektor pMOWS-puro. (A) Schematische Übersicht der Klonierung. Der pMOWS-puro-Vektor lag bereits mit PmeI geschnitten und dephosphoryliert in der AG Scheller vor. Das Ausgangsplasmid p409-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL wurde mit PmeI geschnitten, die Schnittstellen sind als schwarze Linien dargestellt. Anschließend wurden *insert* und pMOWS-puro-Vektor ligiert. Das *insert* ist in rot markiert. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com. (B) Restriktionsspaltung nach Plasmid-DNA Midi-Präparation von pMOWS-puro-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL mit EcoRI (1), EcoRV (2) und HindIII (3). Zwei Klone wurden analysiert. Erwartete Fragmentgrößen (bp): (1) 6590 bp, 630 bp, 402 bp, 155 bp, 41 bp, 34 bp; (2) 3604 bp, 2502 bp, 1671 bp, 75 bp; (3) 4768 bp, 2074 bp, 1010 bp. Zudem wurde als Kontrolle K das ungeschnittene Plasmid (7852 bp) aufgetragen.

3.5.2 Expression des Rezeptors in Ba/F3-gp130 Zelllinien

Weiterführend wurde die chimäre Rezeptorvariante stabil in Ba/F3-gp130 sowie Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien etabliert. Nach Transduktion, Antibiotikaselektion und Passage über 2-3 Wochen erfolgte eine Kontrolle der Rezeptorexpression auf den Zellen mittels

Durchflusszytometrie (Abb. 34). Zur Detektion des IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL wurde der Antikörper α -IL-23R-bio, zur Detektion des bereits etablierten Rezeptors in den Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen der Antikörper α -IL-12R β 1-PE eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten dabei Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen, die in der AG Scheller kontrolliert und stetig passagiert wurden. Das grau hinterlegte Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen, die weder den IL-12R β 1 noch den IL-23R exprimieren und als Negativkontrolle dienen. Alle hierbei untersuchten Ba/F3-gp130 bzw. Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien zeigen eine Expression des IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. Dies wird durch die Verschiebung der Histogramme nach rechts ausgehend von der Negativkontrolle deutlich.

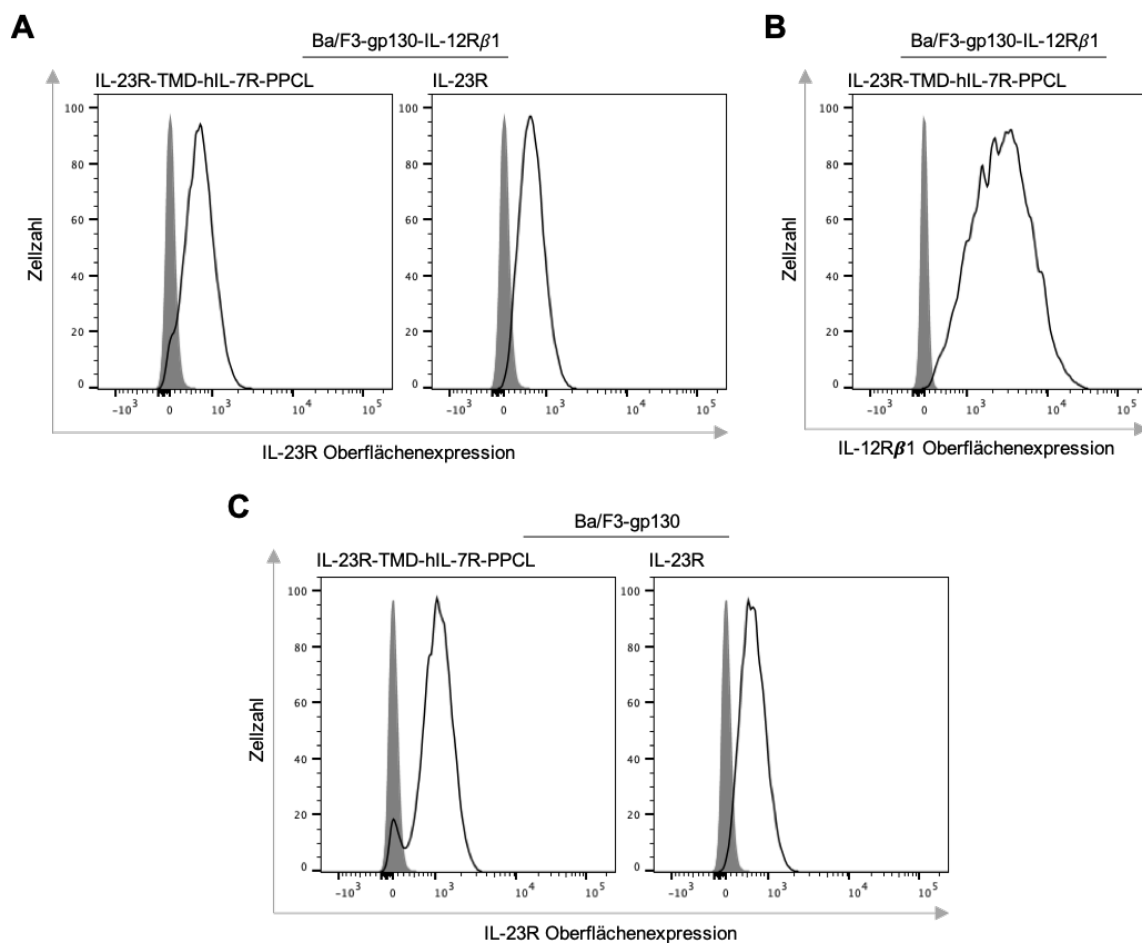


Abb. 34: Analyse der Oberflächenexpression von IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL in verschiedenen Ba/F3-gp130 Zelllinien. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL in unterschiedlichen Ba/F3-gp130 Zelllinien überprüft. **(A)** Detektion von IL-23R in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen. Das graue Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle), das weiße Histogramm zeigt Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R (Positivkontrolle) bzw. IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. Zur Detektion wurde α -IL-23R verwendet. **(B)** Nachweis der IL-12R β 1 Oberflächenexpression in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL Zellen. Die Detektion erfolgte mit α -IL-12R β 1-PE. Ba/F3-gp130 Zellen wurden als Negativkontrolle (graues Histogramm) eingesetzt. **(C)** Detektion von IL-23R in Ba/F3-gp130 Zellen durch Zugabe von α -IL-23R. Das graue Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen (Negativkontrolle), das weiße Histogramm zeigt Ba/F3-gp130 Zellen mit Expression von IL-23R (Positivkontrolle) bzw. IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL.

3.5.3 Chimäre IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL Variante ist konstitutiv aktiv

Nach Analyse der Rezeptorexpression wurden die Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens und intrazellulärer Signaltransduktion untersucht (Abb. 35). Wie bei den IL-23R-gp130 Rezeptorvarianten wurden die Zellen für die Proliferationsanalyse auch hier ohne Zytokin (unstimuliert), mit 0,2% HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 oder 1 µg/ml HIL-23 für 72 h inkubiert, bevor das Proliferationsverhalten bestimmt wurde (Abb. 35A). Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen eingesetzt. Gleichbleibend wie in den vorherigen Analysen proliferieren Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zellen bei Stimulation mit 1 µg/ml HIL-23 nicht mehr. Anders verhält es sich dagegen in Ba/F3-gp130-IL-23R Zellen. Hier fehlt IL-12Rβ1 und die Zellen wachsen kaum bei einer Stimulation mit 10 ng/ml HIL-23. Jedoch fällt auf, dass die Zellen bei Stimulation mit 1 µg/ml HIL-23 proliferieren. Dies deutet auf eine Homodimerisierung des IL-23R durch HIL-23 hin [86]. In Zelllinien mit Expression der IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL Rezeptorvariante ist eine deutliche Proliferation der Zellen auch ohne Zytokinzugabe im Sinne einer konstitutiven Aktivität ersichtlich. Diese konstitutive Aktivierung ist unabhängig vom Vorhandensein des IL-12Rβ1.

Unter gleichen Konditionen wurde eine Analyse der STAT3 Signaltransduktion der Zellen durchgeführt (Abb. 35B). Die Detektion der intrazellulären Signalproteine erfolgte durch Zugabe der Antikörper α-STAT3 und α-pSTAT3. Das kalkulierte Molekulargewicht für STAT3 und pSTAT3 beträgt 80 kDa. Die Aktivierung von STAT3 folgt dabei dem Muster des Proliferationsverhaltens der jeweiligen Zellen.

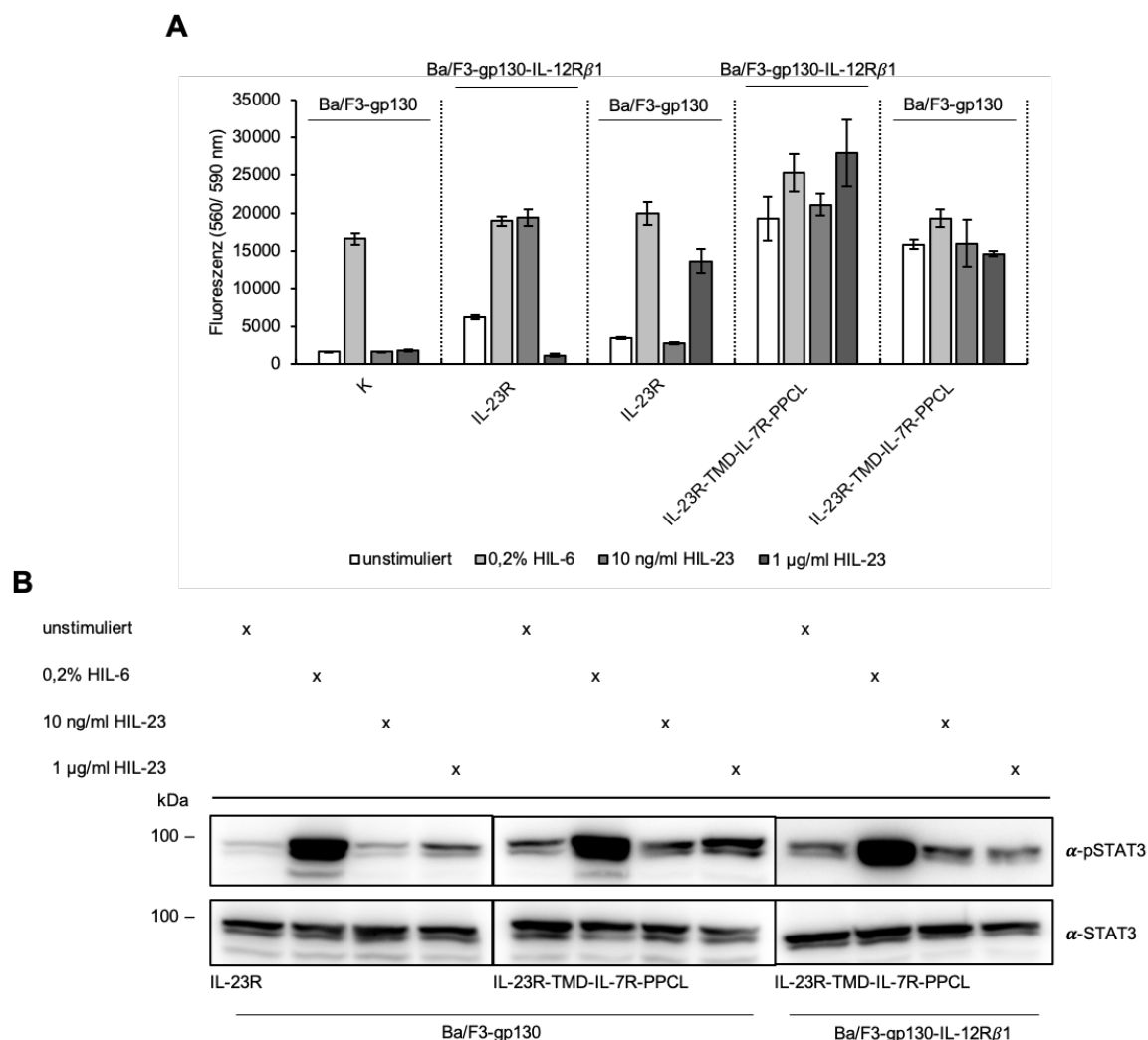


Abb. 35: Analyse des Wachstumsverhaltens und der STAT3 Aktivierung stabiler Ba/F3-gp130 Zelllinien mit IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. (A) Ba/F3-gp130 bzw. Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit Expression des IL-23R oder IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in unterschiedlichen Konditionen untersucht. Als Negativkontrolle (K) wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 72 h ohne Zytokin (weiß), mit 0,2 % HIL-6 (hellgrau), 10 ng/ml HIL-23 (grau), 1 μ g/ml HIL-23 (dunkelgrau) kultiviert. Anschließend wurde die Zellproliferation mittels *CellTiter-Blue*[®] am Fluorometer gemessen. n=3. **(B)** Analyse der STAT3 Aktivierung in stabilen Ba/F3-gp130 bzw. Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zelllinien mit Expression des IL-23R oder IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. Die Zellen wurden unstimuliert gelassen, sowie 30 min mit 0,2 % HIL-6, 10 ng/ml HIL-23 und 1 μ g/ml HIL-23 inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und Western Blot. Zur Detektion wurden die Antikörper α -STAT3 und α -pSTAT3 eingesetzt. Das kalkulierte Molekulargewicht (kDa) für STAT3 und pSTAT3 beträgt 80 kDa. n=2.

Neben der Analyse des Verhaltens stabil transduzierter Zelllinien wurden zudem U4C Zellen mit transienter Expression der Rezeptorvariante hinsichtlich ihrer intrazellulären Signaltransduktion untersucht (Abb. 36). Dafür wurden die U4C Zellen zunächst mit der Rezeptorvariante IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL, IL-12R β 1, IL-23R und IL-12R β 1 gemeinsam mit IL-23R transfiziert, für 48 h in DMEM^{+/+} und 12 h in DMEM^{-/-} (*starving*) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unstimuliert belassen oder mit 10 ng/ml bzw. 1 μ g/ml HIL-23 für 30 min stimuliert. Nach Lyse der Zellen und Western Blot erfolgte die Detektion

zellulärer Proteine durch Zugabe der Antikörper α -IL-23R, α -IL-12R β 1, α -STAT3 und α -pSTAT3. Das kalkulierte Molekulargewicht für STAT3 und pSTAT3 beträgt dabei 80 kDa; IL-12R β 1 73,22 kDa; IL-23R 71,71 kDa und IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL 72,31 kDa. Ebenso wie in der Stimulationsanalyse der stabil etablierten Zelllinien zeigt sich, wenn auch schwächer, eine STAT3 Phosphorylierung ohne Zytokinzugabe in Zellen mit Expression der Rezeptorvariante IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. Auch U4C Zellen mit alleiniger Expression des IL-23R verhalten sich wie in der Stimulationsanalyse, eine STAT3 Phosphorylierung ist bei Stimulation mit 10 ng/ml und 1 μ g/ml HIL-23 deutlich zu erkennen. In Zellen mit gleichzeitiger Expression des IL-12R β 1 und IL-23R ist eine STAT3 Phosphorylierung dagegen erst bei Stimulation mit 1 μ g/ml HIL-23 zu sehen. Hier sind die Rezeptoren im Vergleich zu den anderen transduzierten Zellen allerdings auch deutlich geringer exprimiert.

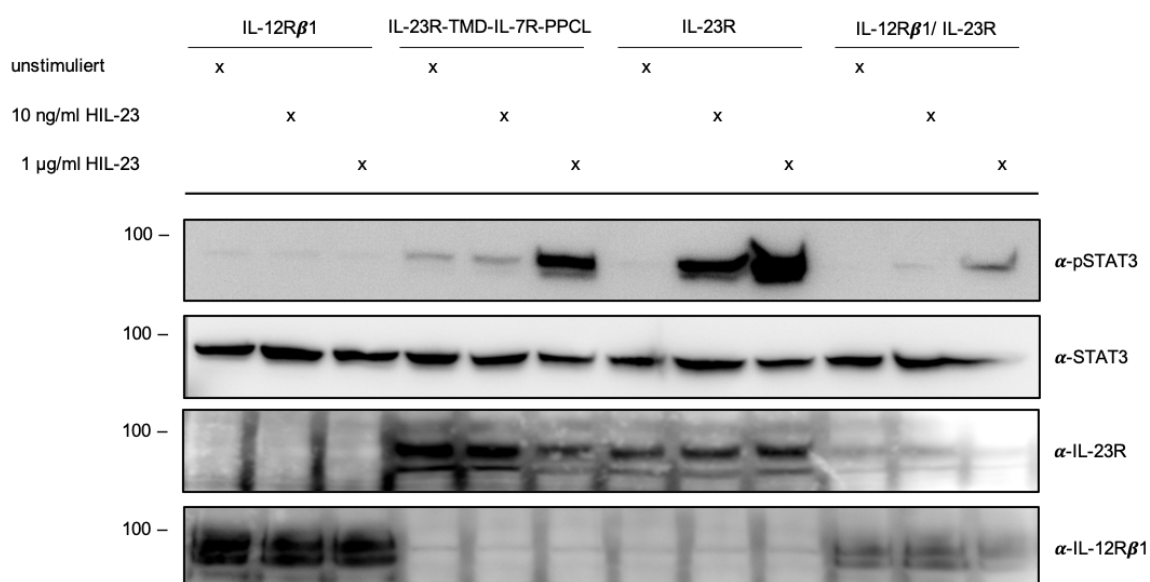


Abb. 36: Analyse der STAT3 Aktivierung in U4C-Zellen nach transienter Transfektion mit IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL. Nach Transfektion der U4C Zellen mit IL-12R β 1, IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL, IL-23R und IL-12R β 1 gemeinsam mit IL-23R wurden die Zellen für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit HIL-23 stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurden α -IL-23R, α -IL-12R β 1, α -pSTAT3 und α -STAT3 verwendet. Das kalkulierte Molekulargewicht für STAT3 und pSTAT3 beträgt dabei 80 kDa; IL-12R β 1 73,22 kDa; IL-23R 71,71 kDa; IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL 72,31 kDa. n=2

4 Diskussion

4.1 Chimäre IL-23R Varianten weisen unterschiedliche Proliferationsmuster auf

Die IL-23 vermittelte Signaltransduktion erfolgt über IL-12R β 1 und IL-23R. Nach Rezeptorbindung kommt es intrazellulär insbesondere zur Phosphorylierung von STAT3 [60]. STAT3 interagiert dabei über „Y₆₁₁FPQ“ und vermutlich auch über Y484 mit dem humanen IL-23R [2, 60]. STAT3 induziert unter anderem die Transkription von SOCS3. SOCS Proteine hemmen normalerweise in einer negativen Rückkopplungsschleife Zytokinsignale [25]. Beschrieben ist dies für den IL-6 Signalweg. Hier bindet SOCS3 über pY759 bzw. das Motiv „VQpY₇₅₉STVVH“ an gp130 und hemmt die STAT3 Aktivität [111, 112]. Y759 dient gleichzeitig als Bindestelle für SHP2, ein wichtiges Signalprotein zur Proliferation der Zellen [84, 109]. Als Pendant dazu könnte im humanen IL-23R das Tyrosin Y397 bzw. das Motiv „WLY₃₉₇EDIPN“ gelten, da SHP2 hierüber vermutlich an den Rezeptor bindet [81]. Trotz der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen interagieren SOCS3 und Y397 wahrscheinlich nicht, denn obwohl IL-23 Stimulation zu einer steigenden SOCS3 Konzentration in Ba/F3-Zellen mit humanen und murinen IL-23R führt, bleibt die STAT3 Aktivität gleichbleibend hoch [81, 86]. Dies wurde auch im Rahmen der Dissertation von Felix Thives-Kurenbach beobachtet [135]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Bereiche innerhalb des humanen IL-23 Rezeptors, die zur SOCS3 Interaktion essenziell sind, ermittelt und durch Klonierung chimärer Rezeptorvarianten aus Anteilen des humanen IL-23R und gp130 genauer charakterisiert werden. Diese identifizierten Bereiche sollten weiterführend dazu genutzt werden, eine SOCS3 Hemmung im IL-23 Signalweg zu induzieren.

Nach Klonierung der chimären Rezeptoren und deren Transduktion in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen wurde zunächst das Proliferationsverhalten der transduzierten Zellen überprüft. Zellen mit IL-23R WT proliferierten nach Zugabe von 10 ng/ml HIL-23, nach Zugabe von 1 μ g/ml HIL-23 jedoch nicht mehr. Gegensätzlich dazu verhielt es sich in den Rezeptorvarianten mit längerem gp130 Anteil: Zellen mit IL-23R-gp130, IL-23R-gp130-642-813, IL-23R-gp130-642-813 Y502F und IL-23R-gp130-642-765 proliferierten weiterhin auch nach Zugabe der höheren Dosis HIL-23. Auffällig war jedoch insbesondere das Proliferationsverhalten von Zellen mit IL-23R-gp130-WLYEDIPN. Trotz vollständiger gp130-Domäne und ausschließlichen Austausch des Motivs „VQYSTVVH“ zu „WLYEDIPN“ aus dem IL-23R WT, verhielten sich die Zellen wieder vergleichbar zu

Zellen mit IL-23R WT. Für eine Veränderung im Proliferationsverhalten der Zellen genügt es jedoch bereits, einzelne Aminosäuren im „WLYEDIPN“-Motiv des IL-23R auszutauschen. Mutation von IP zu VV sowie W und IP zu VVV führten dazu, dass die Zellen erst nach Zugabe der höheren Dosis IL-23 weiterhin proliferierten. Ein vollständiger Austausch des „WLYEDIPN“-Motivs mit „VQYSTVVH“, dem vermeintlichen Pendant im gp130 Rezeptor, führte sogar in beiden Konditionen dazu, dass die Zellen keinerlei Proliferation mehr aufwiesen. Einzig in Zellen mit Rezeptorvariante IL-23R W395V wurde kein Unterschied im Proliferationsverhalten zum WT beobachtet. Gleiches wurde bereits für IL-23R WT, IL-23R W395V, IL-23R-VV und IL-23R-VVV im Rahmen der Dissertation von Franz Christian Horstmeier beschrieben [136]. Die Daten wurden inzwischen publiziert [145].

Diese Beobachtungen legen nahe, dass das Motiv „WLYEDIPN“ im IL-23R einen wichtigen Einfluss auf das Proliferationsverhalten und Überleben von Zellen hat. Da nur SHP2 und nicht STAT3 über Y397 an den Rezeptor bindet, bestärkt es die Beobachtungen, dass der MAPK-Weg eine STAT3 unabhängige Zellproliferation verursacht und „WLYEDIPN“ für die Aktivierung des MAPK-Weges wichtig ist [75, 81]. Veränderungen von I und P führen dazu, dass eine Proliferation der Zellen erst durch eine höhere Dosis an IL-23 erreicht werden kann. Gegebenenfalls stabilisieren diese Aminosäuren die Bindung zwischen SHP2 und Y397 und führen somit zu einer Affinitätssteigerung, ähnlich wie im IL-6 Signalweg für die Interaktion zwischen SOCS3 und gp130 beschrieben wurde [112, 116]. Möglicherweise hat das „WLYEDIPN“-Motiv auch einen Einfluss auf die Aktivierung der JAK2 Kinase nach Stimulation mit IL-23. Es wurde festgestellt, dass der *single nucleotide polymorphism* (SNP) R381Q (murin: R400Q) proximal der Aminosäuresequenz „WLYEDIPN“ im murinen IL-23R zu einer verminderten Aktivität der Januskinase führt [75]. Fraglich ist demzufolge, ob auch die Mutationen W395V, I400V und P401V innerhalb des „WLYEDIPN“-Motivs einen Einfluss auf die Aktivierung von JAK2 haben. Weiterführende Untersuchungen der JAK2 und SHP2 Aktivität nach Stimulation von IL-23R W395V, IL-23R-VV und IL-23R-VVV mit IL-23 bestärken diese Annahme [145].

Anderenfalls könnte man vermuten, dass eine höhere Konzentration an IL-23 zu einer Hemmung der Zellproliferation in Ba/F3-Zellen mit Expression des IL-23R und IL-12R β 1 führt. In diesem Zusammenhang wurde bereits festgestellt, dass verschiedene Dosierungen von IL-23 zu unterschiedlicher T-Zellaktivität in Blasenkrebszellen führen. Eine niedrigere Dosis IL-23 (20 ng/ml) bewirkte dabei eine Zellproliferation, eine höhere Dosis (40 ng/ml) hemmte diese dagegen [146]. Dieses Phänomen konnte in einer weiteren Arbeit nach Stimulation von Lungenkrebszellen mit IL-23 in niedriger und höherer Dosis ebenso

beobachtet werden. Hierbei wurde postuliert, dass die Hemmung der Zellproliferation über IL-12R β 1 vermittelt sein könnte, da IL-23 in niedriger Konzentration nur an IL-23R bindet und erst in höherer Konzentration (40 ng/ml) auch an IL-12R β 1 [147]. Für einen tieferen Einblick in diesen Mechanismus könnten weiterführenden Stimulationsanalysen von Zellen mit Expression des humanen IL-23R jedoch ohne IL-12R β 1 sowie steigenden IL-23 Konzentrationen hilfreich sein, damit das Proliferationsverhalten ohne den postulierten Einfluss von IL-12R β 1 untersucht werden kann.

4.2 Chimäre IL-23R führen zu SOCS3 vermittelter STAT3 Inhibierung

Die Ergebnisse der Stimulationsanalysen über 5 h in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit IL-23R WT unterstützen die vorherigen Beobachtungen, dass die STAT3 Phosphorylierung trotz ansteigender SOCS3 Expression nach Stimulation mit HIL-23 nicht abnimmt [81, 86]. Die Ergebnisse wurden inzwischen veröffentlicht [145]. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied an den durchgeführten Kontrollanalysen nach Stimulation mit HIL-6. Hier nimmt die STAT3 Phosphorylierung mit zunehmender Stimulationsdauer und SOCS3 Expression ab. Gleiches gilt für Ba/F3-gp130-IL12R β 1 Zellen mit Expression der Rezeptorchimäre IL-23R-gp130, IL-23R-gp130-642-813, IL-23R-gp130-642-813 Y502F und IL-23R-gp130-642-765. Hier nimmt die STAT3 Phosphorylierung nach Stimulation mit HIL-23 über einen Zeitraum von 5 h ab [145]. In der Analyse von Zellen mit Expression des IL-23R-gp130-WLYEDIPN konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit keine eindeutige Aussage getroffen werden. In einer Untersuchung schien es, als sei eine Abnahme der STAT3 Phosphorylierung zu beobachten, in weiteren Untersuchungen konnte dies aber nicht mehr bestätigt werden. Da eine SOCS3 vermittelte Hemmung von STAT3 aufgrund des Austauschs des SOCS3-Motivs „VQYSTVVH“ durch das „WLYEDIPN“-Motiv nicht erwartet wurde, wurden die Stimulationsanalysen im Rahmen ihrer Dissertation von Leorina Kashtanjeva erneut durchgeführt. Diese bestätigten die Vermutung, dass eine Hemmung von STAT3 durch SOCS3 in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-gp130-WLYEDIPN nicht stattfindet [145].

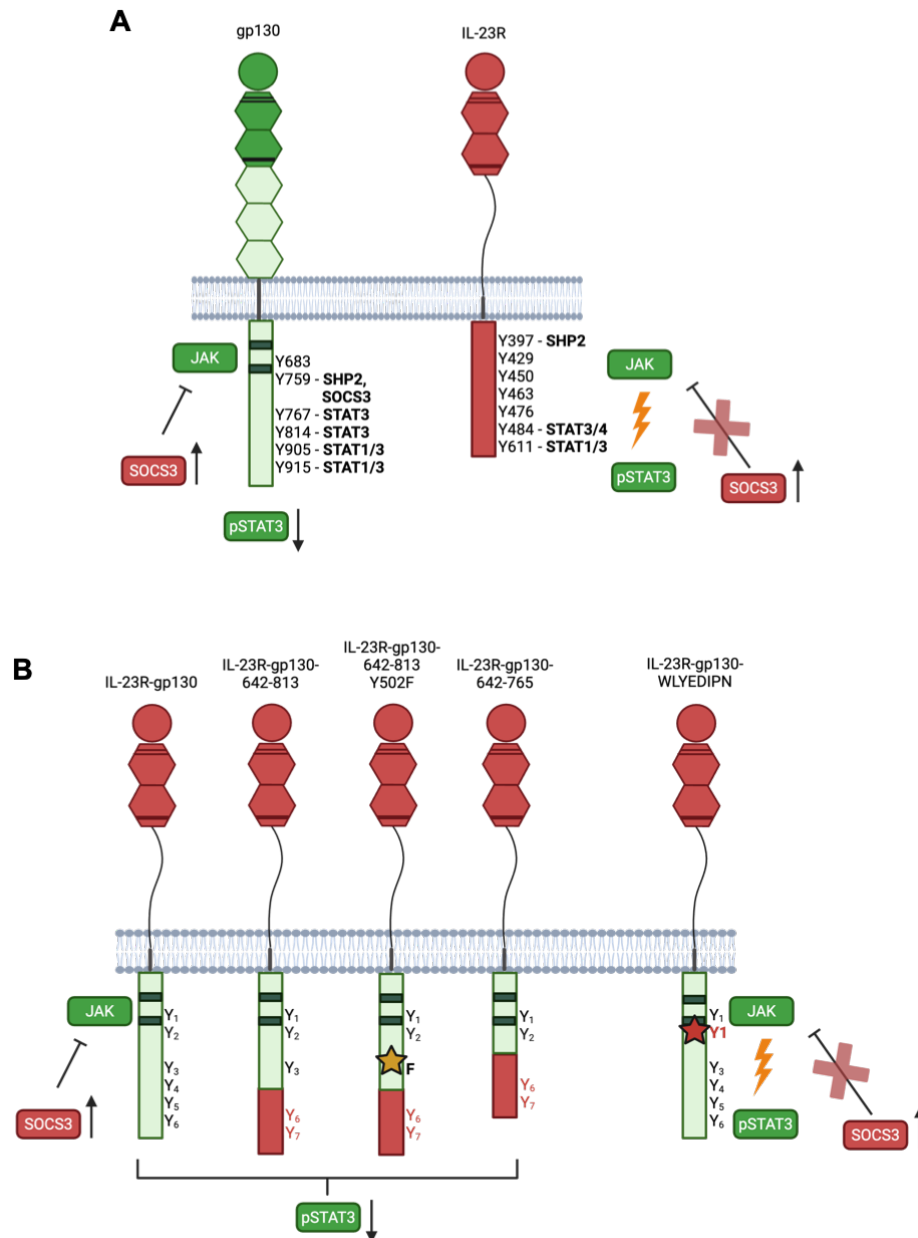


Abb. 37: Schematische Übersicht der chimären Rezeptoren und SOCS3 vermittelte Hemmung der STAT3 Aktivität. (A) Schematische Übersicht des gp130 und IL-23 Rezeptors. Tyrosine (Y) in der Intrazellulärdomäne sind gekennzeichnet. Zum Teil dienen diese als Bindestelle für intrazelluläre Signalproteine wie SHP2, STATs und SOCS3. SOCS3 hemmt über gp130 die Januskinase (JAK), weshalb die STAT3 Aktivierung (pSTAT3) abnimmt. Die SOCS3 Konzentration nimmt zwar auch in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression des IL-23R nach Stimulation mit HIL-23 zu, hemmt hier jedoch nicht die JAK, sodass die STAT3 Aktivität gleichbleibend ist. (B) Schematische Übersicht über die IL-23R-gp130 Rezeptorchimäre. In Ba/F3-gp130-IL-12R β 1 Zellen mit Expression von IL-23R-gp130, IL-23R-gp130-642-813 bzw. Y502F und IL-23R-gp130-642-765 nimmt die STAT3 Aktivität nach Stimulation mit HIL-23 ab, in Zellen mit Expression von IL-23R-gp130-WLYEDIPN hingegen nicht. Die Abbildungen wurden erstellt mit BioRender.com.

Die Ergebnisse der Stimulation von Zellen mit chimären IL-23R-gp130 Varianten unterstützen die These, dass SOCS3 über pY759 mit gp130 interagiert, jedoch gleichzeitig das Motiv „VQYSTVVH“ um Y759 herum zur Interaktion mit SOCS3 relevant ist [111, 112, 145]. Insbesondere zeigt sich dies in Stimulationsanalysen von Zellen mit Expression der

Rezeptorvariante IL-23R-gp130-WLYEDIPN. Obwohl hier nur das SOCS3 Bindemotiv „VQYSTVVH“ ausgetauscht und die restliche ICD des gp130 belassen wurde, kommt es nicht zu einer SOCS3 vermittelten Hemmung von STAT3 [145]. Dies bekräftigt, dass nicht nur das Tyrosin, sondern insbesondere die Sequenz um das Tyrosin herum für eine SOCS3 vermittelte Hemmung von STAT3 essenziell ist. Interessant wäre es nachfolgend herauszufinden, ob die Veränderung einzelner Aminosäuren im „VQYSTVVH“-Motiv des gp130 Rezeptors zu einer Veränderung der SOCS3 vermittelten Hemmung von STAT3 führen. Hierfür könnte man analog der Mutationen im „WLYEDIPN“-Motiv einzelne Mutationen in die vermeintlich für die SOCS3 Bindung relevanten AS einführen und die Stimulationsanalysen mit den veränderten Rezeptoren erneut durchführen. Darüber hinaus wäre sicherlich auch eine Überlegung, ob chimäre IL-23 Rezeptoren mit einem noch kürzeren Anteil der ICD von gp130 weiterhin eine SOCS3 vermittelte Hemmung der STAT3 Aktivität aufweisen. Damit ließe sich eingrenzen, ob und welche weiteren Abschnitte im gp130 Rezeptor zur SOCS3 Interaktion nötig wären. Hierbei stellt sich auch die Frage, ob die Mutation einzelner Aminosäuren im „WLYEDIPN“-Motiv, wie in den Rezeptorvarianten IL-23R W395V, IL-23R-VV und IL-23R-VVV, oder das „VQYSTVVH“-Motiv alleine, wie in den Rezeptorvarianten IL-23R-SOCS-A, IL-23R-SOCS-B und IL-23R-SOCS-C, bereits zu einer SOCS3 Interaktion mit dem IL-23R führen oder ob weitere Veränderungen in der ICD des Rezeptors dafür nötig wären. Dies könnte durch zukünftige Stimulationsanalysen mit den entsprechenden Zelllinien untersucht werden.

Darüber hinaus stellt sich auch die Frage, ob das Motiv „WLYEDIPN“ im IL-23R WT entscheidend dafür ist, dass SOCS3 nicht mit dem Rezeptor interagieren kann. Diese Überlegung ließe sich überprüfen, indem im IL-23R WT das „WLYEDIPN“-Motiv mit „VQYSTVVH“ ausgetauscht würde. Dies wurde in der IL-23R-SOCS-A Variante auch durchgeführt, hier ergab sich allerdings das Problem, dass die Zellen unter allen Konditionen nach HIL-23 Stimulation nicht mehr proliferierten, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass „WLYEDIPN“ für die Proliferation von Zellen mit IL-23R essenziell ist (siehe 4.1). Allerdings wiesen die Zellen auch keinerlei STAT3 Aktivität nach Stimulation mit HIL-23 mehr auf, obwohl Y397 eigentlich nur die Interaktion mit SHP2 und nicht mit STAT3 vermittelt. Fraglich ist demzufolge, ob eine SOCS3 Interaktion mit dem „VQYSTVVH“-Motiv die Ursache hierfür sein könnte. SOCS3 könnte den JAK/STAT-Weg inhibiert haben und gleichzeitig SHP2 von Y397 verdrängt haben, sodass weder STAT3 Aktivierung noch eine Proliferation vorhanden wäre. Allerdings steht diese Überlegungen im Kontrast zum IL-6 Signalweg. Hier proliferieren die Zellen weiterhin trotz SOCS3 vermittelter Hemmung der

STAT3 Aktivität. Naheliegender wäre vermutlich, dass Veränderungen im „WLYEDIPN“-Motiv die Interaktion und Aktivität der Januskinase beeinflusst. Sollte die JAK2 nicht mehr binden oder aktiviert werden können, so kann weder SHP2 noch STAT3 aktiviert werden. In weiterführenden Stimulationsanalysen mit HIL-23 wurde deshalb neben der Untersuchung des Aktivierungsverhaltens von STAT3 auch das von JAK2 und ERK untersucht. Die Daten wurden inzwischen publiziert und bestätigen die aufgestellte Vermutung [145].

Weiterführend wäre es sinnvoll herauszufinden, welche Auswirkungen die Veränderungen in den chimären IL-23R in Bezug auf die T_H17-Zelldifferenzierung haben. Die IL-23 Signaltransduktion führt zur Aktivierung von T_H17-Zellen und Produktion von IL-17, was neben der Abwehr von Krankheitserregern auch zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beiträgt [91-93]. Es stellt sich die Frage, ob durch die Induktion einer SOCS3 vermittelten Reduktion des IL-23 Signals in T-Zellen, im Vergleich zu T-Zellen mit IL-23R WT, die Differenzierung zu T_H17-Zellen und Sekretion von IL-17 vermindert wird. Bereits postuliert wurde, dass in Mäusen mit SOCS3 *knockout* in T-Zellen eine höhere Aktivität von STAT3 und vermehrte Differenzierung von T_H17-Zellen nach IL-23 Stimulation zu beobachten sei [87]. Diese Beobachtung ist widersprüchlich zur ausgehenden These, dass SOCS3 keinen Einfluss auf die STAT3 Aktivität in der IL-23 Signaltransduktion habe. Allerdings zeigt sich der Unterschied in der STAT3 Aktivität zwischen SOCS3 *knockout* und WT Mäusen insbesondere nach 15 min, wohingegen die Ergebnisse der Zellkulturanalysen dieser Arbeit und auch in der Arbeit von Engelowski et. al, eine deutlich erhöhte SOCS3 Konzentration in Ba/F3-Zellen erst nach 1-2 h zeigen [86, 145]. Zudem nimmt die Phosphorylierung von STAT3 in der IL-6 Signaltransduktion und auch in den chimären Rezeptorvarianten nach IL-23 Stimulation erst nach etwa 2-3 h ab [86, 145]. In Studien mit MEF-Zellen wurde gezeigt, dass eine Hemmung durch SOCS3 insbesondere in der späten Phase der IL-6 Signaltransduktion auftritt [113]. Dementsprechend ist ein Einfluss und eine Inhibierung durch SOCS3 nach bereits 15 min unwahrscheinlich und ein Unterschied zwischen SOCS3 *knockout* und WT Mäusen nicht eindeutig nachweisbar. Anders wäre es jedoch, wenn in T-Zellen eine SOCS3 Expressionssteigerung deutlich früher einsetzen würde als in Ba/F3-Zellen. Es wäre vermutlich sinnvoll, zusätzlich zur Analyse des Einflusses der chimären Rezeptoren auf die T_H17-Differenzierung zu untersuchen, wie sich die SOCS3 Konzentration im Verhältnis zur STAT3 Aktivierung in T-Zellen verhält. Eine gewisse Limitation und somit keine direkte Vergleichbarkeit könnte in dieser Arbeit jedoch vorgelegen haben, da es sich im Gegensatz zu den Beobachtungen von *knockout* Mäusen in den Zellkulturanalysen um Überstimulationsanalysen handelt.

4.3 Insertion von PPCL führt zur konstitutiven Aktivität des IL-23R

Konstitutiv aktive Rezeptoren aktivieren intrazelluläre Signalwege ohne vorherige Zytokinbindung und spielen deshalb eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen [5, 123, 124]. Bei Untersuchungen des IL-7R α konnte nachgewiesen werden, dass die Insertion eines „PPCL“-Motivs in die TMD eine Homodimerisierung durch Disulfidbrückenbindung und somit eine konstitutive Aktivität des Rezeptors hervorruft [131]. Diese Eigenschaft führt unter anderem zur Entstehung von ALL bei Kindern [131-133]. Gleichzeitig verstärkt das „PPCL“-Motiv im IL-7R α bei Expression in CAR-T-Zellen deren antitumorale Aktivität *in vitro* und könnte dementsprechend zu therapeutischen Zwecken genutzt werden [129].

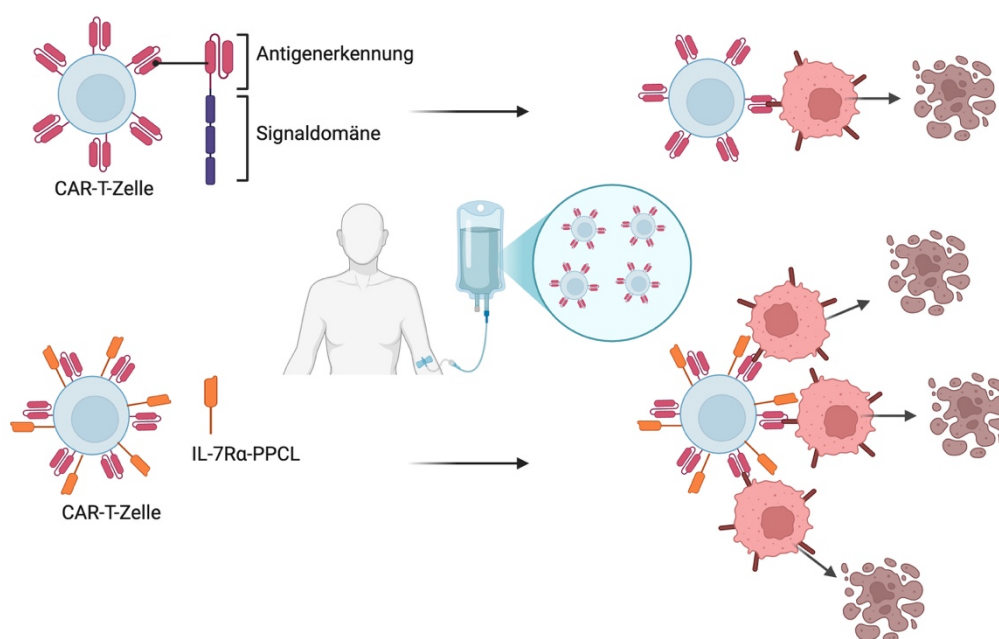


Abb: 38: Schematische Übersicht CAR-T-Zelltherapie. T-Zellen mit *chimeric antigen receptor* (CAR) binden nach Verabreichung an spezifische Oberflächenantigene von Zielzellen und führen zu deren Untergang. Ko-Expression eines synthetisch mutierten IL-7R α mit Insertion von PPCL verstärkt die antitumorale Aktivität der CAR-T-Zellen. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com.

Konstitutiv aktive Rezeptoren bieten den Vorteil, dass diese unabhängig von Zytokinsignalen wirken, wodurch Nebenwirkungen durch systemische Zytokinwirkung vermieden werden [129, 148]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob nach Austausch der TMD des IL-23R mit der TMD des IL-7R und Insertion der „PPCL“-Sequenz, eine konstitutive Aktivität auch beim IL-23R zu beobachten ist.

Bereits in den Analysen der Zellproliferation fällt auf, dass die Ba/F3-Zellen mit IL-23R-TMD-IL7R-PPCL auch ohne Zytokinzugabe proliferieren, sogar in Zellen ohne Expression des zur IL-23 Signaltransduktion eigentlich benötigten IL-12R β 1. Gleiches gilt für die STAT3 Aktivität in Ba/F3-gp130 und U4C Zelllinien, die IL-23R-TMD-IL7R-PPCL

exprimieren. Eine STAT3 Aktivierung ist im unstimulierten Zustand deutlich zu erkennen. Die Zugabe von IL-23 verstärkt die STAT3 Aktivierung des Rezeptors zusätzlich. Die Ergebnisse wurden im Anschluss dieser Experimente publiziert und bestätigen, dass durch Austausch der TMD eine konstitutive Aktivität durch Ausbildung einer Disulfidbrückenbindung zwischen den Cysteinen und somit Homodimerisierung des IL-23R hervorgerufen werden kann [138]. Sie liefern neue Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung aktueller Therapien, insbesondere der CAR-T-Zelltherapie.

In klinischen Studien konnte bereits ein positiver Effekt in der Behandlung des metastasierten Melanoms mit CAR-T-Zellen und Zuhilfenahme des eng verwandten IL-12 erzielt werden, dies hatte allerdings bedeutende Nebenwirkungen durch die systemische Zytokinwirkung zur Folge [148]. Die Expression eines konstitutiv aktiven IL-23R auf CAR-T-Zellen sollte hingegen keine systemische Wirkung verursachen, sondern insbesondere die Lebensdauer der Zellen verlängern und somit die antitumorale Aktivität verstärken. Neben der Zellproliferation fördert die IL-23 Signaltransduktion zudem auch die Differenzierung von T_H17 -Zellen. T_H17 -Zellen sind häufig in der Tumormikroumgebung anzutreffen und weisen sowohl tumorfördernde als auch antitumorale Eigenschaften auf [149]. Je nach Tumorentität könnte dies zur antitumoralen Aktivität der CAR-T-Zellen beitragen. Dies konnte bereits *in vitro* nach Transduktion der IL-23 p40 Untereinheit in die CAR-T-Zellen beobachtet werden [150]. Die Zellen waren dadurch fähig, IL-23 zu sekretieren und über einen autokrinen Mechanismus antitumoral zu wirken. [150]. IL-23 ist darüber hinaus an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, unter anderem chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, beteiligt [95, 96]. In einer Studie zu Morbus Crohn konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Expression von IL-23R auf CAR- T_{reg} -Zellen zu einer Verstärkung der regulatorischen Funktion der T_{reg} -Zellen führt und somit Immunsupprimierend wirkt [151].

Prinzipiell ließen sich die Beobachtungen einer konstitutiven Aktivität auf alle möglichen dimeren Rezeptoren übertragen, sofern die TMD des jeweiligen Rezeptors ausgetauscht werden würde. So wurde dies zum Beispiel auch für gp130 und synthetisch hergestellte Rezeptoren beschrieben [138]. Dies lässt eine große Vielfalt für potenzielle Therapien oder Verbesserung bestehender Therapien entstehen. Darüber hinaus könnten konstitutiv aktive Rezeptoren in der Erforschung überaktiver Signalwege eingesetzt werden. Die Ergebnisse bieten hier eine alternative Methode zur Generierung überaktiver Signalwege in Zellkulturen. Eine konstitutive Aktivität des IL-23R wurde bisher nur durch größere Veränderungen am Rezeptor wie Deletion der gesamten ECD, Deletion der *stalk region* oder Austauschs der TMD wie u.a. in dieser Arbeit erreicht [74, 138]. Mutationen, die zu einer *in vivo*

vorkommenden konstitutiven Aktivität des IL-23R führen, sind bisher nicht bekannt [5]. Gegebenenfalls benötigt es für eine konstitutive Aktivität des IL-23R jedoch gar nicht so große Veränderungen wie der Austausch der TMD oder Deletion der *stalk region*. Die Insertion von unpaarigen Cysteinen in der TMD ist immerhin für eine konstitutive Aktivität des IL-7R ausreichend und trägt beispielsweise zur Entstehung von ALL bei [131-133]. Diese Veränderung im Rezeptor ist vergleichsweise gering, sodass eine spontane Entstehung solcher Mutation denkbar ist. Dahingehend wäre es sinnvoll, Cysteinmutationen in die TMD des IL-23R einzuführen und zu analysieren, ob so bereits eine konstitutive Aktivität erreicht wird. Sollte dies für den IL-23R zutreffen, so könnten Cysteininsertionen möglicherweise einen Pathomechanismus in der Entstehung IL-23 vermittelter Autoimmunerkrankungen darstellen. Interessant wäre in diesem Rahmen, SNPs der TMD im IL-23R von Patient*innen mit IL-23 vermittelten Autoimmunerkrankungen zu analysieren und herauszufinden, ob Cysteininsertionen häufiger vorkommen als im gesunden Kollektiv.

4.4 Homodimerisierung von IL-23R nach Stimulation mit IL-23

In den Proliferations- und Stimulationsanalysen, die im Rahmen der Untersuchung der konstitutiv aktiven IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL Variante durchgeführt wurden, lässt sich ein Phänomen erkennen, das bereits bei synthetisch hergestellten IL-23R beobachtet wurde [86]. In Zellen, die ausschließlich IL-23R und nicht den für die IL-23 Signaltransduktion zusätzlich benötigten IL-12R β 1 exprimieren, findet eine Proliferation nach Zugabe von 1 μ g/ml HIL-23 statt. Gleichzeitig wird auch eine STAT3 Aktivierung beobachtet. Dies wird am ehesten durch eine Homodimerisierung des IL-23R begründet. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die komplexe Struktur des IL-23R [152]. In U4C Zelllinien ist eine Homodimerisierung des IL-23R bereits ab 10 ng/ml HIL-23 zu sehen. Die Ergebnisse unterstützen die These, dass der IL-23R Homodimere bilden und somit das IL-23 Signal weiterleiten kann. Das bedeutet, dass auch in Zellen ohne Expression des IL-12R β 1 eine IL-23 vermittelte Aktivität möglich ist. Dies könnte einen entscheidenden Faktor in der Entstehung von IL-23 vermittelten Autoimmunerkrankungen darstellen.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wichtige neue Erkenntnisse über die IL-23 Signaltransduktion und bieten einen Ausgangspunkt für weiterfolgende Analysen für ein besseres Verständnis der IL-23 vermittelten Signalwege. Eine umfangliche Kenntnis über IL-23, den IL-23R und die nachgeschalteten Effekte ist für die Erforschung des Pathomechanismus und der Bekämpfung IL-23 vermittelter Erkrankungen essenziell.

Im Rahmen der Arbeit fiel insbesondere das unterschiedliche Proliferationsverhalten der Rezeptorchimäre im Vergleich zum IL-23R WT auf. Das Motiv „WLYEDIPN“ und die Aktivierung der JAK2 sowie des MAPK-Weges scheinen dabei eine besondere Rolle zu spielen. Um zu differenzieren, welche Aminosäuren für die Aktivierung der Januskinase wichtig sind, wären weiterführende Untersuchungen der JAK2 Aktivität nach Stimulation von IL-23R W395V, IL-23R-VV und IL-23R-VVV mit IL-23 sinnvoll.

Darüber hinaus wäre es auch wichtig, weitere chimäre Rezeptoren zu generieren, um den Mechanismus der STAT3 Aktivierung/ Reprimierung noch genauer zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits zwei weitere chimäre Rezeptoren kloniert, die für nachfolgende Stimulations- und Proliferationsanalysen verwendet werden sollen: IL-23R-SOCS-C, mit einem murinen SOCS3 Bindemotiv des gp130, sowie IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813. Diese Variante bietet eine Alternative zu den chimären IL-23R Varianten, da hierbei IL-12R β 1 verändert wurde. Darüber hinaus könnten Stimulationsanalysen analog der IL-23R-gp130 Varianten für diese beiden Rezeptorchimäre sowie die weiteren IL-23 Rezeptorvarianten mit SOCS3 Bindemotiven sinnvoll sein. Diese könnten dazu beitragen, dass das SOCS3 Bindemotiv des gp130 eindeutiger charakterisiert werden kann.

Weiterhin könnte der gp130 Anteil der chimären Rezeptorvarianten sukzessive verkürzt werden, sodass eine genauere Angabe zu zusätzlich benötigten Motiven oder Aminosäuren zur Interaktion zwischen Rezeptor und SOCS3 gemacht werden könnte. Auch die Einführung einzelner Mutationen in die „VQYSTVVH“- und „WLYEDIPN“-Motive sowie Veränderung des Abstands intrazellulärer Abschnitte der Rezeptoren zur TMD könnten zu einem besseren Verständnis der zur Signaltransduktion und Proliferation der Zellen benötigten Strukturen beitragen.

Um den Unterschied zwischen IL-23R WT und den IL-23R-gp130 Rezeptorchimären in der Interaktion mit SOCS3 und bezüglich ihres Proliferationsverhaltens noch deutlicher darzustellen, wäre eine Analyse des Bindungsverhaltens zwischen Rezeptor und

SOCS3 mittels Immunpräzipitation oder Durchflusszytometrie sinnvoll. Damit ließe sich auch eine Veränderung der Bindungsaffinität innerhalb der Rezeptorchimäre feststellen.

Eine weiterführende Analyse von SNPs insbesondere in der TMD sowie des Homodimerisierungsverhaltens des IL-23R könnte einen entscheidenden Beitrag zum Pathomechanismus IL-23 vermittelter Autoimmunerkrankungen liefern. Darüber hinaus ist eine konstitutive Aktivität des IL-23R als therapeutischer Einsatz in der CAR-T-Zelltherapie denkbar.

5 Literatur- und Quellenangaben

1. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
2. Floss, D.M., J.M. Moll, and J. Scheller, *IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions*. Cells, 2020. **9**(10).
3. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**(Suppl 1): p. S34-45.
4. Guzeloglu-Kayisli, O., U.A. Kayisli, and H.S. Taylor, *The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(1): p. 62-79.
5. Floss, D.M. and J. Scheller, *Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2019. **47**: p. 1-20.
6. Morris, R., N.J. Kershaw, and J.J. Babon, *The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway*. Protein Sci, 2018. **27**(12): p. 1984-2009.
7. Bazan, J.F., *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. Immunol Today, 1990. **11**(10): p. 350-4.
8. Siupka, P., O.T. Hamming, L. Kang, H.H. Gad, and R. Hartmann, *A conserved sugar bridge connected to the WSXWS motif has an important role for transport of IL-21R to the plasma membrane*. Genes Immun, 2015. **16**(6): p. 405-13.
9. Miyazaki, T., M. Maruyama, G. Yamada, M. Hatakeyama, and T. Taniguchi, *The integrity of the conserved 'WS motif' common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction*. EMBO Journal, 1991. **10**(11): p. 3191-7.
10. Wang, X., P. Lupardus, S.L. Laporte, and K.C. Garcia, *Structural biology of shared cytokine receptors*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 29-60.
11. Ihle, J.N., B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, K. Yamamoto, W.E. Thierfelder, B. Kreider, and O. Silvennoinen, *Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(5): p. 222-7.
12. Ihle, J.N., *Cytokine receptor signalling*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 591-4.
13. Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto, *Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11349-53.
14. Ihle, J.N. and I.M. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. Trends Genet, 1995. **11**(2): p. 69-74.
15. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.
16. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 211-7.
17. Horvath, C.M., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr., *A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain*. Genes Dev, 1995. **9**(8): p. 984-94.
18. Yoshimura, A., M. Ito, S. Chikuma, T. Akanuma, and H. Nakatsukasa, *Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(7).
19. Linossi, E.M. and S.E. Nicholson, *Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins*. Immunol Rev, 2015. **266**(1): p. 123-33.

20. Babon, J.J., E.J. McManus, S. Yao, D.P. DeSouza, L.A. Mielke, N.S. Sprigg, T.A. Willson, D.J. Hilton, N.A. Nicola, M. Baca, S.E. Nicholson, and R.S. Norton, *The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 205-16.
21. Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira, and T. Kishimoto, *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 924-9.
22. Starr, R., T.A. Willson, E.M. Viney, L.J. Murray, J.R. Rayner, B.J. Jenkins, T.J. Gonda, W.S. Alexander, D. Metcalf, N.A. Nicola, and D.J. Hilton, *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
23. Endo, T.A., M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiyama, and A. Yoshimura, *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 921-4.
24. Hilton, D.J., R.T. Richardson, W.S. Alexander, E.M. Viney, T.A. Willson, N.S. Sprigg, R. Starr, S.E. Nicholson, D. Metcalf, and N.A. Nicola, *Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 114-9.
25. Kershaw, N.J., J.M. Murphy, I.S. Lucet, N.A. Nicola, and J.J. Babon, *Regulation of Janus kinases by SOCS proteins*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(4): p. 1042-7.
26. Yoshimura, A., T. Ohkubo, T. Kiguchi, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, T. Hara, and A. Miyajima, *A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors*. EMBO Journal, 1995. **14**(12): p. 2816-26.
27. Matsumoto, A., M. Masuhara, K. Mitsui, M. Yokouchi, M. Ohtsubo, H. Misawa, A. Miyajima, and A. Yoshimura, *CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3148-54.
28. Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J.N. Ihle, and A. Yoshimura, *The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop*. EMBO Journal, 1999. **18**(5): p. 1309-20.
29. Kamura, T., S. Sato, D. Haque, L. Liu, W.G. Kaelin, Jr., R.C. Conaway, and J.W. Conaway, *The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families*. Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3872-81.
30. Zhang, J.G., A. Farley, S.E. Nicholson, T.A. Willson, L.M. Zugaro, R.J. Simpson, R.L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B.T. Kile, S.B. Kent, W.S. Alexander, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca, *The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2071-6.
31. Kamura, T., K. Maenaka, S. Kotoshiba, M. Matsumoto, D. Kohda, R.C. Conaway, J.W. Conaway, and K.I. Nakayama, *VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3055-65.

32. Babon, J.J., J.K. Sabo, J.G. Zhang, N.A. Nicola, and R.S. Norton, *The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signalling suppression*. J Mol Biol, 2009. **387**(1): p. 162-74.
33. Sasaki, A., H. Yasukawa, A. Suzuki, S. Kamizono, T. Syoda, I. Kinjyo, M. Sasaki, J.A. Johnston, and A. Yoshimura, *Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain*. Genes Cells, 1999. **4**(6): p. 339-51.
34. Kershaw, N.J., J.M. Murphy, N.P. Liau, L.N. Varghese, A. Laktyushin, E.L. Whitlock, I.S. Lucet, N.A. Nicola, and J.J. Babon, *SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(4): p. 469-76.
35. Babon, J.J., N.J. Kershaw, J.M. Murphy, L.N. Varghese, A. Laktyushin, S.N. Young, I.S. Lucet, R.S. Norton, and N.A. Nicola, *Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity*. Immunity, 2012. **36**(2): p. 239-50.
36. Babon, J.J., S. Yao, D.P. DeSouza, C.F. Harrison, L.J. Fabri, E. Liepinsh, S.D. Scrofani, M. Baca, and R.S. Norton, *Secondary structure assignment of mouse SOCS3 by NMR defines the domain boundaries and identifies an unstructured insertion in the SH2 domain*. FEBS Journal, 2005. **272**(23): p. 6120-30.
37. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner, *Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis*. Science, 1986. **234**(4774): p. 364-8.
38. Vignali, D.A. and V.K. Kuchroo, *IL-12 family cytokines: immunological playmakers*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 722-8.
39. Hildenbrand, K., I. Aschenbrenner, F.C. Franke, O. Devergne, and M.J. Feige, *Biogenesis and engineering of interleukin 12 family cytokines*. Trends Biochem Sci, 2022.
40. Tait Wojno, E.D., C.A. Hunter, and J.S. Stumhofer, *The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 851-870.
41. Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri, *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 827-45.
42. Wolf, S.F., P.A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R.M. Hewick, and et al., *Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells*. J Immunol, 1991. **146**(9): p. 3074-81.
43. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein, *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
44. Pflanz, S., J.C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, J.L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T.K. McClanahan, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick, and R.A. Kastelein, *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 779-90.

45. Devergne, O., M. Birkenbach, and E. Kieff, *Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12041-6.
46. Wang, X., Y. Wei, H. Xiao, X. Liu, Y. Zhang, G. Han, G. Chen, C. Hou, N. Ma, B. Shen, Y. Li, C.E. Egwuagu, and R. Wang, *A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice*. Eur J Immunol, 2016. **46**(6): p. 1343-50.
47. Ramnath, D., K. Tunny, D.M. Hohenhaus, C.M. Pitts, A.S. Bergot, P.M. Hogarth, J.A. Hamilton, R. Kapetanovic, R.A. Sturm, G.M. Scholz, and M.J. Sweet, *TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes*. Immunol Cell Biol, 2015. **93**(9): p. 771-9.
48. Ding, M., H.X. Wang, S.J. Gao, X.F. Lai, A.L. Li, J.J. Bao, F.F. Hosyanto, and L. Xu, *Significant elevated CXCL14 and decreased IL-39 levels in patients with tuberculosis*. Open Life Sci, 2023. **18**(1): p. 20220594.
49. Batten, M. and N. Ghilardi, *The biology and therapeutic potential of interleukin 27*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(7): p. 661-72.
50. Wang, R.X., C.R. Yu, R.M. Mahdi, and C.E. Egwuagu, *Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 36012-21.
51. Flores, R.R., E. Kim, L. Zhou, C. Yang, J. Zhao, A. Gambotto, and P.D. Robbins, *IL-Y, a synthetic member of the IL-12 cytokine family, suppresses the development of type 1 diabetes in NOD mice*. Eur J Immunol, 2015. **45**(11): p. 3114-25.
52. Cui, X., W. Liu, H. Jiang, Q. Zhao, Y. Hu, X. Tang, X. Liu, H. Dai, H. Rui, and B. Liu, *IL-12 family cytokines and autoimmune diseases: A potential therapeutic target?* J Transl Autoimmun, 2025. **10**: p. 100263.
53. Ling, P., M.K. Gately, U. Gubler, A.S. Stern, P. Lin, K. Hollfelder, C. Su, Y.C. Pan, and J. Hakimi, *Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 116-27.
54. Cooper, A.M. and S.A. Khader, *IL-12p40: an inherently agonistic cytokine*. Trends Immunol, 2007. **28**(1): p. 33-8.
55. Stumhofer, J.S., E.D. Tait, W.J. Quinn, 3rd, N. Hosken, B. Spudy, R. Goenka, C.A. Fielding, A.C. O'Hara, Y. Chen, M.L. Jones, C.J. Saris, S. Rose-John, D.J. Cua, S.A. Jones, M.M. Elloso, J. Grötzinger, M.P. Cancro, S.D. Levin, and C.A. Hunter, *A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1119-26.
56. Hildenbrand, K., S. Bohnacker, P.R. Menon, A. Kerle, U.F. Prodjinotho, F. Hartung, P.C. Strasser, D.A.M. Catici, F. Rührnößl, M. Haslbeck, K. Schumann, S.I. Müller, C.P. da Costa, J. Esser-von Bieren, and M.J. Feige, *Human interleukin-12 α and EBI3 are cytokines with anti-inflammatory functions*. Sci Adv, 2023. **9**(43): p. eadg6874.
57. Hasegawa, H., I. Mizoguchi, Y. Chiba, M. Ohashi, M. Xu, and T. Yoshimoto, *Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 479.
58. Rose-John, S., J. Scheller, and F. Schaper, *"Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 471-4.
59. Presky, D.H., H. Yang, L.J. Minetti, A.O. Chua, N. Nabavi, C.Y. Wu, M.K. Gately, and U. Gubler, *A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 14002-7.

60. Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K.P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A.M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D.M. Rennick, R.A. Kastelein, R. de Waal Malefyt, and K.W. Moore, *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5699-708.
61. Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J.F. Bazan, J.H. Phillips, T.K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, and R.A. Kastelein, *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2225-31.
62. Collison, L.W., G.M. Delgoffe, C.S. Guy, K.M. Vignali, V. Chaturvedi, D. Fairweather, A.R. Satoskar, K.C. Garcia, C.A. Hunter, C.G. Drake, P.J. Murray, and D.A. Vignali, *The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional*. Nat Immunol, 2012. **13**(3): p. 290-9.
63. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
64. Manetti, R., P. Parronchi, M.G. Giudizi, M.P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani, *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1199-204.
65. Schinocca, C., C. Rizzo, S. Fasano, G. Grasso, L. La Barbera, F. Ciccia, and G. Guggino, *Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 637829.
66. Yoshida, H. and C.A. Hunter, *The immunobiology of interleukin-27*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 417-43.
67. Stumhofer, J.S., A. Laurence, E.H. Wilson, E. Huang, C.M. Tato, L.M. Johnson, A.V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C.J. Saris, J.J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, and C.A. Hunter, *Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 937-45.
68. Awasthi, A., Y. Carrier, J.P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R.A. Flavell, V.K. Kuchroo, M. Oukka, and H.L. Weiner, *A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1380-9.
69. Hall, A.O., D.P. Beiting, C. Tato, B. John, G. Oldenhove, C.G. Lombana, G.H. Pritchard, J.S. Silver, N. Bouladoux, J.S. Stumhofer, T.H. Harris, J. Grainger, E.D. Wojno, S. Wagage, D.S. Roos, P. Scott, L.A. Turka, S. Cherry, S.L. Reiner, D. Cua, Y. Belkaid, M.M. Elloso, and C.A. Hunter, *The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 511-23.
70. Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali, *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
71. Collison, L.W., V. Chaturvedi, A.L. Henderson, P.R. Giacomini, C. Guy, J. Bankoti, D. Finkelstein, K. Forbes, C.J. Workman, S.A. Brown, J.E. Reh, M.L. Jones, H.T. Ni, D. Artis, M.J. Turk, and D.A. Vignali, *IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1093-101.
72. Egwuagu, C.E., C.R. Yu, L. Sun, and R. Wang, *Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 587-93.

73. Schröder, J., J.M. Moll, P. Baran, J. Grötzinger, J. Scheller, and D.M. Floss, *Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β 1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III*. J Biol Chem, 2015. **290**(1): p. 359-70.
74. Hummel, T.M., T. Ackfeld, M. Schönberg, G. Ciupka, F. Schulz, A. Oberdoerster, J. Grötzinger, J. Scheller, and D.M. Floss, *Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(17).
75. Floss, D.M., T. Klöcker, J. Schröder, L. Lamertz, S. Mrotzek, B. Strobl, H. Hermanns, and J. Scheller, *Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(14): p. 2301-16.
76. Bacon, C.M., D.W. McVicar, J.R. Ortaldo, R.C. Rees, J.J. O'Shea, and J.A. Johnston, *Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 399-404.
77. Zou, J., D.H. Presky, C.Y. Wu, and U. Gubler, *Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits β 1 and β 2 and JAK kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 6073-7.
78. Tanner, J.W., W. Chen, R.L. Young, G.D. Longmore, and A.S. Shaw, *The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6523-30.
79. Pidasheva, S., S. Trifari, A. Phillips, J.A. Hackney, Y. Ma, A. Smith, S.J. Sohn, H. Spits, R.D. Little, T.W. Behrens, L. Honigberg, N. Ghilardi, and H.F. Clark, *Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25038.
80. Floss, D.M., J. Schröder, M. Franke, and J. Scheller, *Insights into IL-23 biology: From structure to function*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 569-78.
81. Floss, D.M., S. Mrotzek, T. Klöcker, J. Schröder, J. Grötzinger, S. Rose-John, and J. Scheller, *Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor*. J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19386-400.
82. Naeger, L.K., J. McKinney, A. Salvekar, and T. Hoey, *Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 1875-8.
83. Yao, B.B., P. Niu, C.S. Surowy, and C.R. Faltynek, *Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(1): p. 147-55.
84. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 2)(Pt 2): p. 297-314.
85. Yamamoto, K., M. Yamaguchi, N. Miyasaka, and O. Miura, *SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor β 2 subunit*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(4): p. 1188-93.
86. Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J.M. Moll, D.M. Floß, P.A. Lang, and J. Scheller, *Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2034.
87. Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B.M. Zhu, C. Tato, A. Yoshimura, L. Hennighausen, and J.J. O'Shea, *Selective regulatory function of Socs3*

- in the formation of IL-17-secreting T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8137-42.
88. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney, *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.* J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
 89. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.* Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
 90. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.* Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
 91. Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J.J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque, *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
 92. Curtis, M.M. and S.S. Way, *Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens.* Immunology, 2009. **126**(2): p. 177-85.
 93. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
 94. Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D. Sedgwick, *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.* Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
 95. Duerr, R.H., K.D. Taylor, S.R. Brant, J.D. Rioux, M.S. Silverberg, M.J. Daly, A.H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L.W. Datta, E.O. Kistner, L.P. Schumm, A.T. Lee, P.K. Gregersen, M.M. Barmada, J.I. Rotter, D.L. Nicolae, and J.H. Cho, *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.* Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
 96. Schmitt, H., M.F. Neurath, and R. Atreya, *Role of the IL23/IL17 Pathway in Crohn's Disease.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 622934.
 97. Lee, E., W.L. Trepicchio, J.L. Oestreicher, D. Pittman, F. Wang, F. Chamian, M. Dhodapkar, and J.G. Krueger, *Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris.* J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 125-30.
 98. Chan, J.R., W. Blumenschein, E. Murphy, C. Diveu, M. Wiekowski, S. Abbondanzo, L. Lucian, R. Geissler, S. Brodie, A.B. Kimball, D.M. Gorman, K. Smith, R. de Waal Malefyt, R.A. Kastelein, T.K. McClanahan, and E.P. Bowman, *IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis.* J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2577-87.
 99. Murphy, C.A., C.L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R.A. Kastelein, J.D. Sedgwick, and D.J. Cua, *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
 100. Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D.J. Cua, and H. Takayanagi, *Th17*

- functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.* J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2673-82.
101. Langowski, J.L., X. Zhang, L. Wu, J.D. Mattson, T. Chen, K. Smith, B. Basham, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and M. Olt, *IL-23 promotes tumour incidence and growth.* Nature, 2006. **442**(7101): p. 461-5.
 102. Yan, J., M.J. Smyth, and M.W.L. Teng, *Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(7).
 103. Murakami, M., D. Kamimura, and T. Hirano, *Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines.* Immunity, 2019. **50**(4): p. 812-831.
 104. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130.* Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-57.
 105. Lütticken, C., U.M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A.G. Harpur, A.F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, and et al., *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130.* Science, 1994. **263**(5143): p. 89-92.
 106. Stahl, N., T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, and et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components.* Science, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
 107. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(2).
 108. Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P.C. Heinrich, and L. Graeve, *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation.* J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12991-8.
 109. Fuhrer, D.K., G.S. Feng, and Y.C. Yang, *Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin-11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes.* J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24826-30.
 110. Eulenfeld, R., A. Dittrich, C. Khouri, P.J. Müller, B. Mütze, A. Wolf, and F. Schaper, *Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs.* Eur J Cell Biol, 2012. **91**(6-7): p. 486-95.
 111. Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P.C. Heinrich, and F. Schaper, *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130.* J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12848-56.
 112. Nicholson, S.E., D. De Souza, L.J. Fabri, J. Corbin, T.A. Willson, J.G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A.D. Nash, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca, *Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6493-8.
 113. Fiebelkow, J., A. Guendel, B. Guendel, N. Mehwald, T. Jetka, M. Komorowski, S. Waldherr, F. Schaper, and A. Dittrich, *The tyrosine phosphatase SHP2 increases robustness and information transfer within IL-6-induced JAK/STAT signalling.* Cell Commun Signal, 2021. **19**(1): p. 94.
 114. Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K.R. Chien, and A. Yoshimura, *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages.* Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 551-6.

115. Croker, B.A., D.L. Krebs, J.G. Zhang, S. Wormald, T.A. Willson, E.G. Stanley, L. Robb, C.J. Greenhalgh, I. Förster, B.E. Clausen, N.A. Nicola, D. Metcalf, D.J. Hilton, A.W. Roberts, and W.S. Alexander, *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 540-5.
116. Bergamin, E., J. Wu, and S.R. Hubbard, *Structural basis for phosphotyrosine recognition by suppressor of cytokine signaling-3*. Structure, 2006. **14**(8): p. 1285-92.
117. Babon, J.J., L.N. Varghese, and N.A. Nicola, *Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3*. Semin Immunol, 2014. **26**(1): p. 13-9.
118. Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. **58**(3): p. 573-81.
119. Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga, and T. Kishimoto, *IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase*. Science, 1993. **260**(5115): p. 1808-10.
120. Lust, J.A., K.A. Donovan, M.P. Kline, P.R. Greipp, R.A. Kyle, and N.J. Maihle, *Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor*. Cytokine, 1992. **4**(2): p. 96-100.
121. Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Günther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. Eur J Immunol, 1993. **23**(2): p. 473-80.
122. Mackiewicz, A., H. Schooltink, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins*. J Immunol, 1992. **149**(6): p. 2021-7.
123. Shea, J., D. Frucht, and C. Duchett, *Cytokines and Cytokine receptors In Clinical Immunology, principles and practice*. 2nd edition) Mosby. Ch12 (1, 2001: p. 1-22.
124. Du, Z. and C.M. Lovly, *Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer*. Molecular Cancer, 2018. **17**(1): p. 58.
125. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
126. Verstraete, K., F. Peelman, H. Braun, J. Lopez, D. Van Rompaey, A. Dansercoer, I. Vandenberghe, K. Pauwels, J. Tavernier, B.N. Lambrecht, H. Hammad, H. De Winter, R. Beyaert, G. Lippens, and S.N. Savvides, *Structure and antagonism of the receptor complex mediated by human TSLP in allergy and asthma*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14937.
127. Sudo, T., S. Nishikawa, N. Ohno, N. Akiyama, M. Tamakoshi, H. Yoshida, and S. Nishikawa, *Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9125-9.
128. Peschon, J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, J.D. Meyer, and B.L. Davison, *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
129. Shum, T., B. Omer, H. Tashiro, R.L. Kruse, D.L. Wagner, K. Parikh, Z. Yi, T. Sauer, D. Liu, R. Parihar, P. Castillo, H. Liu, M.K. Brenner, L.S. Metelitsa, S. Gottschalk, and C.M. Rooney, *Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells*. Cancer Discov, 2017. **7**(11): p. 1238-1247.
130. Puel, A., S.F. Ziegler, R.H. Buckley, and W.J. Leonard, *Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency*. Nat Genet, 1998. **20**(4): p. 394-7.

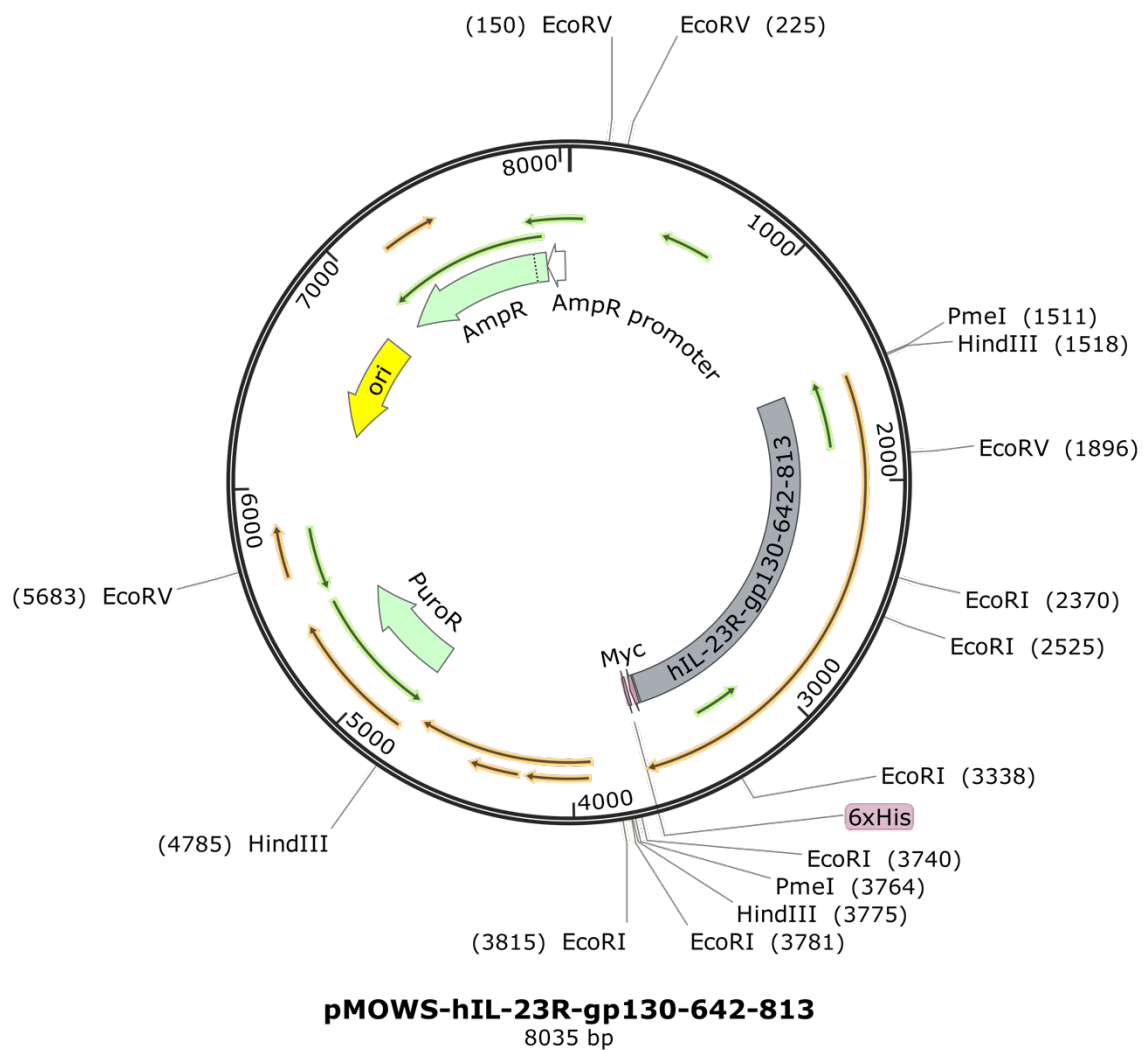
131. Shochat, C., N. Tal, O.R. Bandapalli, C. Palmi, I. Ganmore, G. te Kronnie, G. Cario, G. Cazzaniga, A.E. Kulozik, M. Stanulla, M. Schrappe, A. Biondi, G. Basso, D. Bercovich, M.U. Muckenthaler, and S. Izraeli, *Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias*. J Exp Med, 2011. **208**(5): p. 901-8.
132. Zenatti, P.P., D. Ribeiro, W. Li, L. Zuurbier, M.C. Silva, M. Paganin, J. Tritapoe, J.A. Hixon, A.B. Silveira, B.A. Cardoso, L.M. Sarmiento, N. Correia, M.L. Toribio, J. Kobarg, M. Horstmann, R. Pieters, S.R. Brandalise, A.A. Ferrando, J.P. Meijerink, S.K. Durum, J.A. Yunes, and J.T. Barata, *Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Nat Genet, 2011. **43**(10): p. 932-9.
133. Shochat, C., N. Tal, V. Gryshkova, Y. Birger, O.R. Bandapalli, G. Cazzaniga, N. Gershman, A.E. Kulozik, A. Biondi, M.R. Mansour, J.C. Twizere, M.U. Muckenthaler, N. Ben-Tal, S.N. Constantinescu, D. Bercovich, and S. Izraeli, *Novel activating mutations lacking cysteine in type I cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2014. **124**(1): p. 106-10.
134. Franke, M., J. Schröder, N. Monhasery, T. Ackfeld, T.M. Hummel, B. Rabe, C. Garbers, C. Becker-Pauly, D.M. Floss, and J. Scheller, *Human and Murine Interleukin 23 Receptors Are Novel Substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10 and ADAM17*. J Biol Chem, 2016. **291**(20): p. 10551-61.
135. Thives-Kurenbach, F., *Analyse putativer Interleukin-23 Rezeptor interagierender Proteine*, in *Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Düsseldorf*. 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
136. Horstmeier, F.C., *Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion von IL-23 und eines möglichen Einflusses von SOCS3 und CIB2*, in *Institut für Biochemie und Molekularbiologie II Düsseldorf*. 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
137. Suthaus, J., A. Tillmann, I. Lorenzen, E. Bulanova, S. Rose-John, and J. Scheller, *Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(15): p. 2797-807.
138. Baumgärtner, L.A.F., J. Ettich, H. Balles, D.J. Lapp, S. Mossner, C. Bassenge, M. Ouzin, H. Hanenberg, J. Scheller, and D.M. Floss, *Unpaired cysteine insertions favor transmembrane dimerization and induce ligand-independent constitutive cytokine receptor signaling*. Biol Chem, 2024.
139. Gesiorowski, A., J. Ettich, J. Werner, C. Wittich, S. Pieper, G. Padrini, K. Behnke, D.M. Floss, P.A. Lang, J.M. Moll, and J. Scheller, *Bispecific soluble cytokine receptor-nanobody fusions inhibit Interleukin (IL)-6 trans-signaling and IL-12/23 or tumor necrosis factor (TNF) signaling*. J Biol Chem, 2023. **299**(11): p. 105343.
140. Behrmann, I., T. Smyczek, P.C. Heinrich, H. Schmitz-Van de Leur, W. Komyod, B. Giese, G. Müller-Newen, S. Haan, and C. Haan, *Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: the exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak.receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35486-93.
141. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger, and S. Rose-John, *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(2): p. 142-5.
142. Warrens, A.N., M.D. Jones, and R.I. Lechler, *Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest*. Gene, 1997. **186**(1): p. 29-35.

143. Edelheit, O., A. Hanukoglu, and I. Hanukoglu, *Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies*. BMC Biotechnol, 2009. **9**: p. 61.
144. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
145. Kashtanjeva, L., C. Ruhland, F.C. Horstmeier, F. Thives-Kurenbach, J. Ettich, G. Padriani, S. Streuber, J. Scheller, A. Dittrich, and D.M. Floss, *Receptor engineering constitutes feedback control and robustness of IL-23R signaling and highlights importance of intracellular cytokine receptor signaling motifs*. Cell Commun Signal, 2026. **24**(1): p. 51.
146. Wang, P., Y. Zhang, J. Zhang, J. Jiang, F. Jin, and Z. Sun, *IL-23 concentration-dependently regulates T24 cell proliferation, migration and invasion and is associated with prognosis in patients with bladder cancer*. Oncol Rep, 2018. **40**(6): p. 3685-3693.
147. Li, J., L. Zhang, J. Zhang, Y. Wei, K. Li, L. Huang, S. Zhang, B. Gao, X. Wang, and P. Lin, *Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor*. Carcinogenesis, 2013. **34**(3): p. 658-66.
148. Zhang, L., R.A. Morgan, J.D. Beane, Z. Zheng, M.E. Dudley, S.H. Kassim, A.V. Nahvi, L.T. Ngo, R.M. Sherry, G.Q. Phan, M.S. Hughes, U.S. Kammula, S.A. Feldman, M.A. Toomey, S.P. Kerkar, N.P. Restifo, J.C. Yang, and S.A. Rosenberg, *Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(10): p. 2278-88.
149. Chang, S.H., *T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer*. Arch Pharm Res, 2019. **42**(7): p. 549-559.
150. Ma, X., P. Shou, C. Smith, Y. Chen, H. Du, C. Sun, N. Porterfield Kren, D. Michaud, S. Ahn, B. Vincent, B. Savoldo, Y. Pylayeva-Gupta, S. Zhang, G. Dotti, and Y. Xu, *Interleukin-23 engineering improves CAR T cell function in solid tumors*. Nat Biotechnol, 2020. **38**(4): p. 448-459.
151. Cui, Y., M. David, L. Bouchareychas, S. Rouquier, S. Sajuthi, M. Ayrault, C. Navarin, G. Lara, A. Lafon, G. Saviane, S. Boulakirba, A. Menardi, A. Demory, J. Frikeche, S. de la Forest Divonne Beghelli, H.H. Lu, C. Dumont, T. Abel, D. Fenard, M. de la Rosa, and J. Gertner-Dardenne, *IL23R-Specific CAR Tregs for the Treatment of Crohn's Disease*. J Crohns Colitis, 2025. **19**(3).
152. Bloch, Y., J. Felix, R. Merceron, M. Provost, R.A. Symakani, R. De Backer, E. Lambert, A.R. Mehdipour, and S.N. Savvides, *Structures of complete extracellular receptor assemblies mediated by IL-12 and IL-23*. Nat Struct Mol Biol, 2024. **31**(4): p. 591-597.

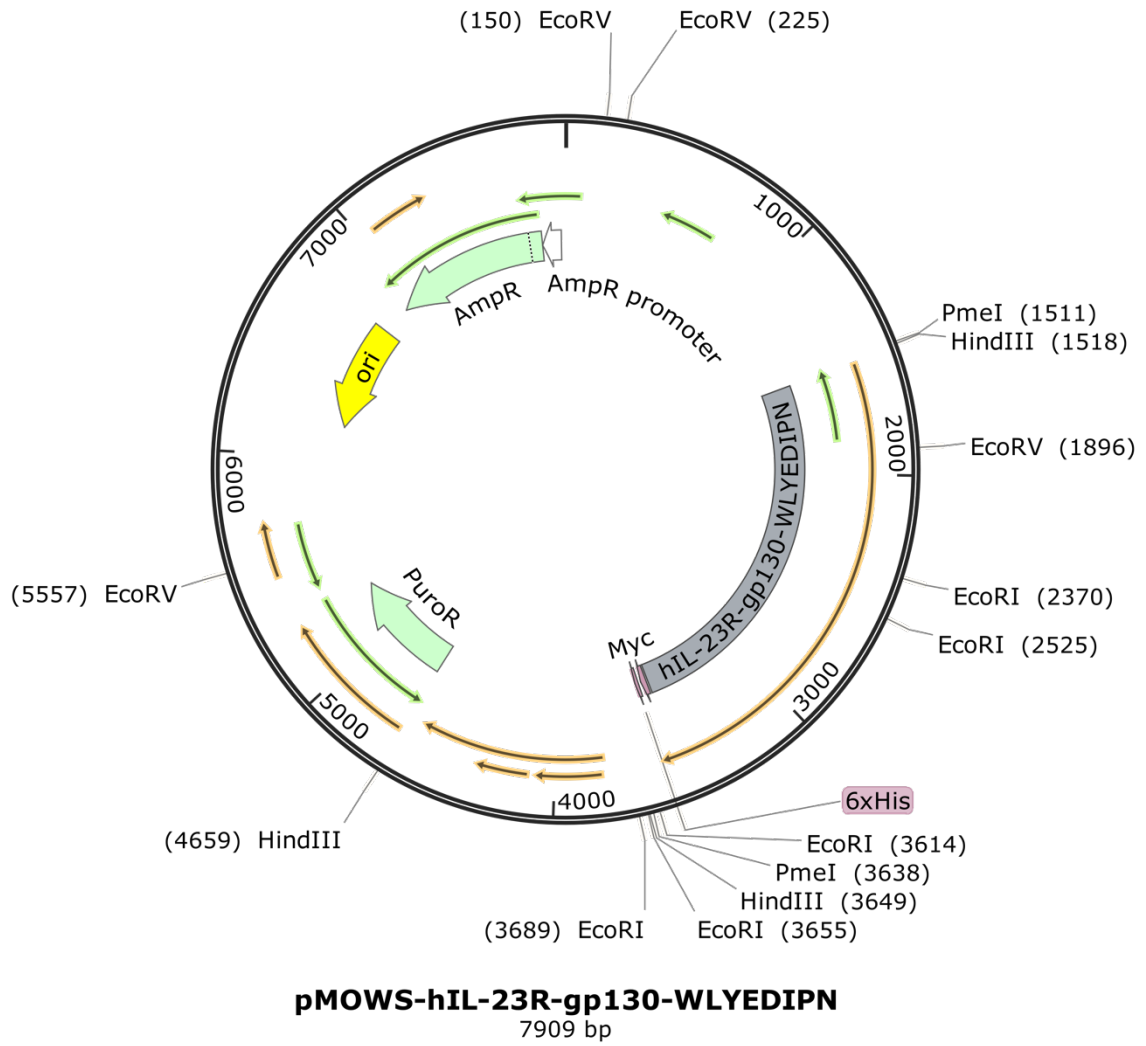
6 Anhang

6.1 Vektorkarten

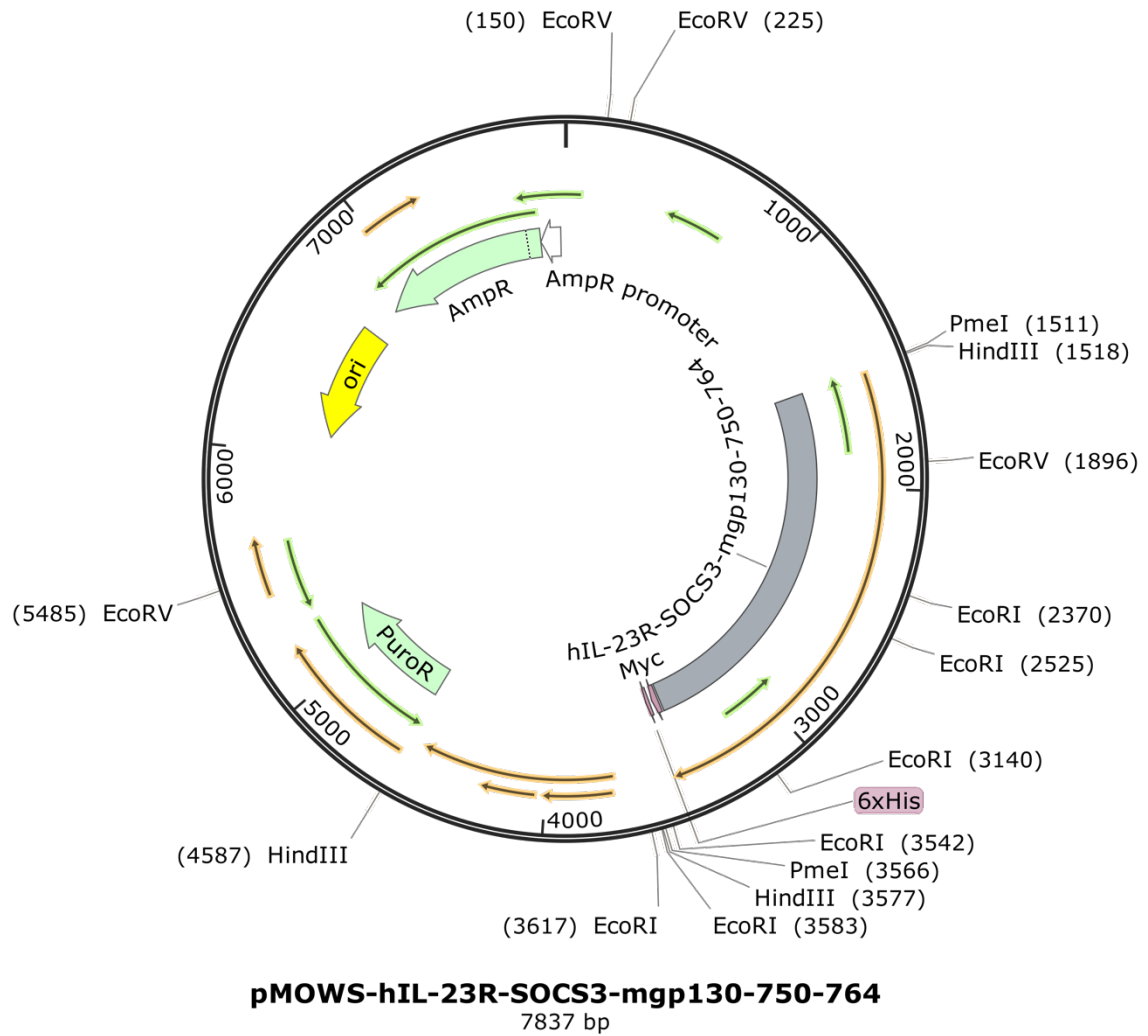
Im Folgenden finden sich die Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit klonierten pMOWS- bzw. p409-Vektoren der chimären IL-23R- und IL-12R β 1-Varianten. Relevante Restriktionsschnittstellen, *open reading frames*, sowie für den Rezeptor und Antibiotikaresistenz kodierende DNA-Abschnitte sind eingezeichnet. Die Vektorgrößen sind in bp angegeben.



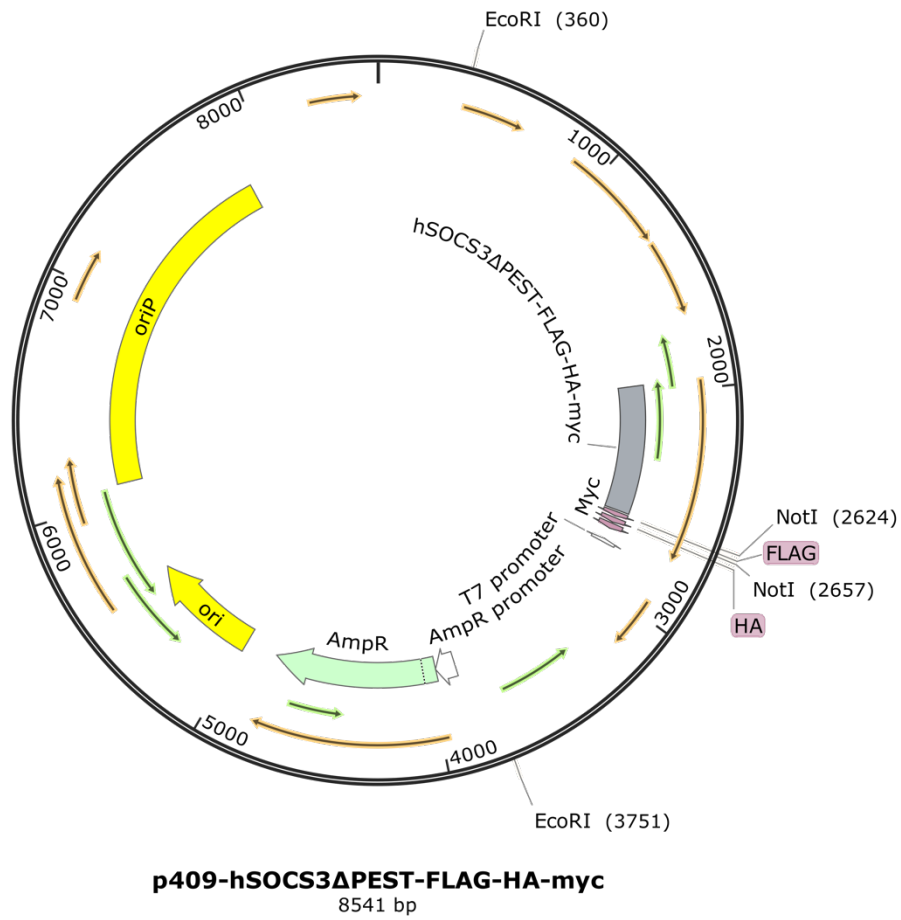
Ergänzende Abb. 1: Vektorkarte von pMOWS-puro-IL-23R-gp130-642-813



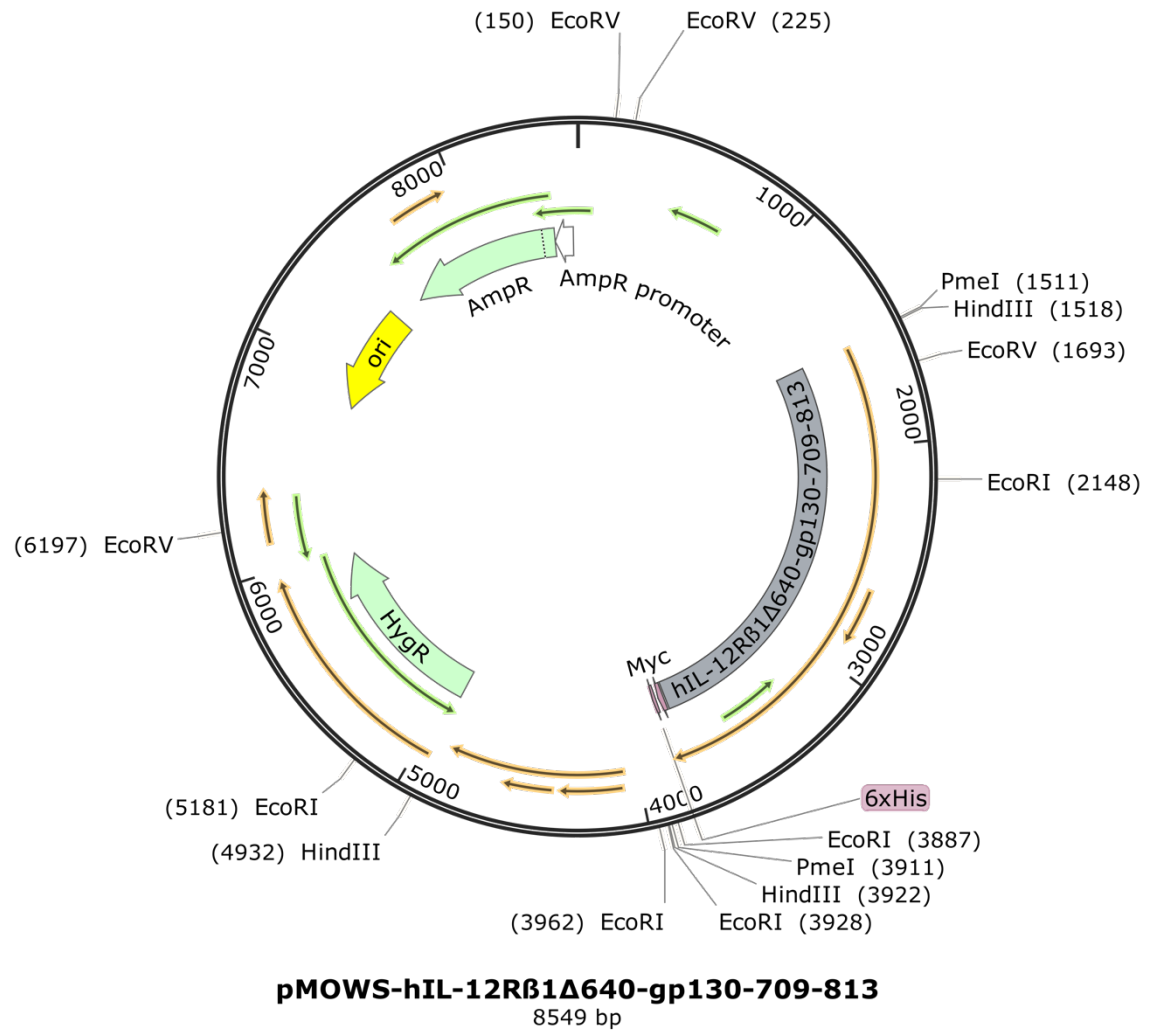
Ergänzende Abb. 2: Vektorkarte von pMOWS-puro-IL-23R-gp130-WLYEDIPN



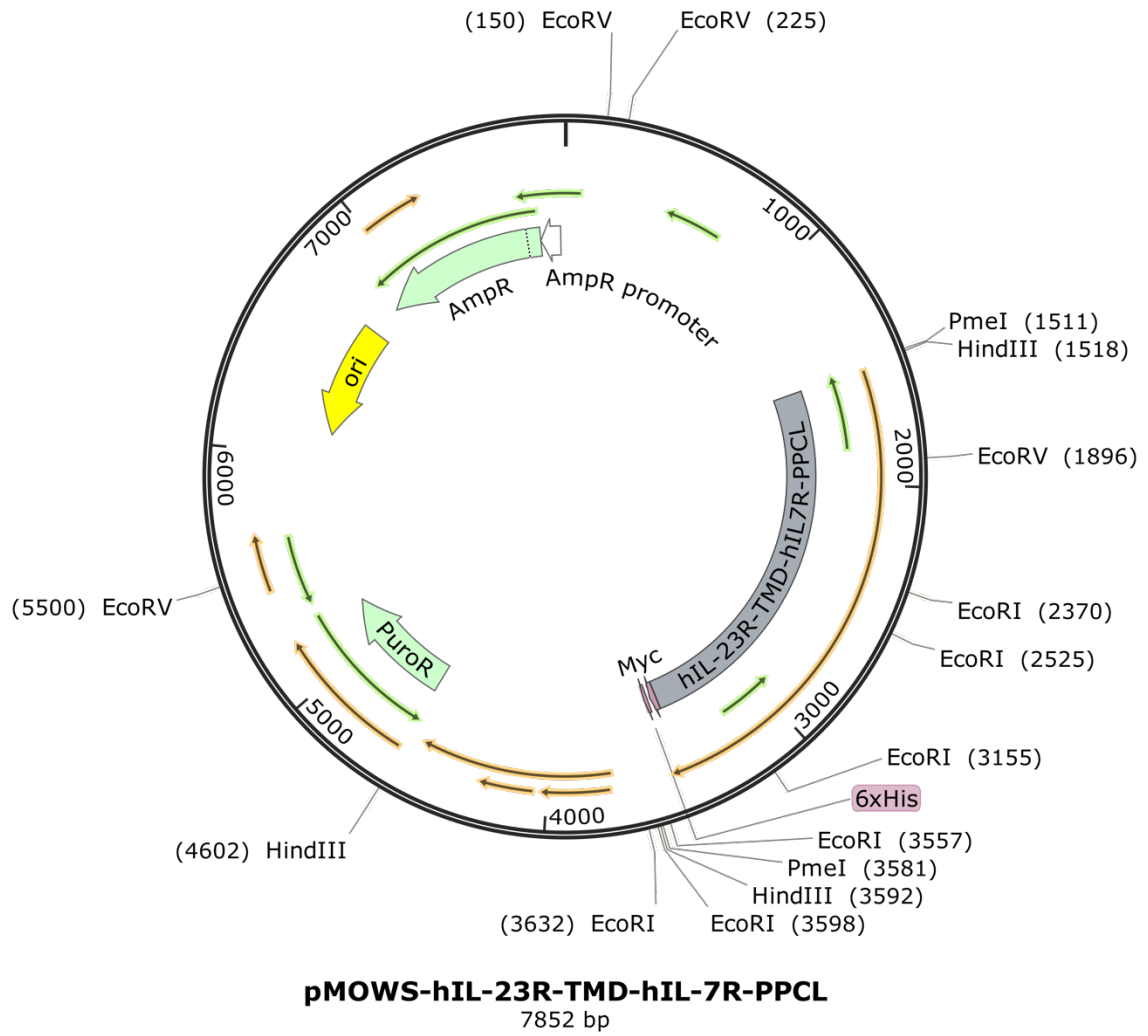
Ergänzende Abb. 3: Vektorkarte von pMOWS-puro-IL-23R-SOCS3-gp130-750-764 (SOCS-C)



Ergänzende Abb. 4: Vektorkarte von p409-SOCS3ΔPEST-FLAG-HA-myc

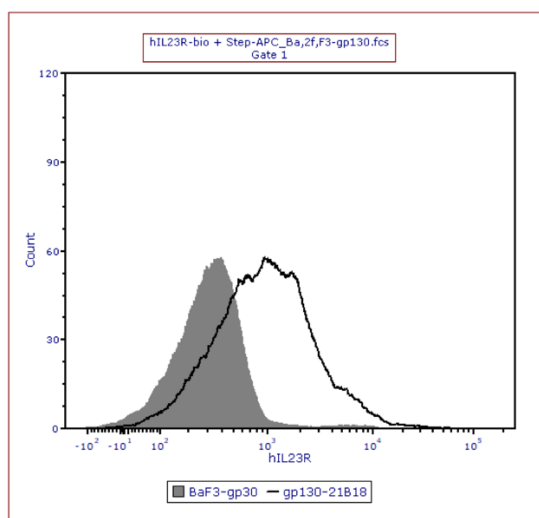


Ergänzende Abb. 5: Vektorkarte von pMOWS-hygro-IL-12R β 1 Δ 640-gp130-709-813

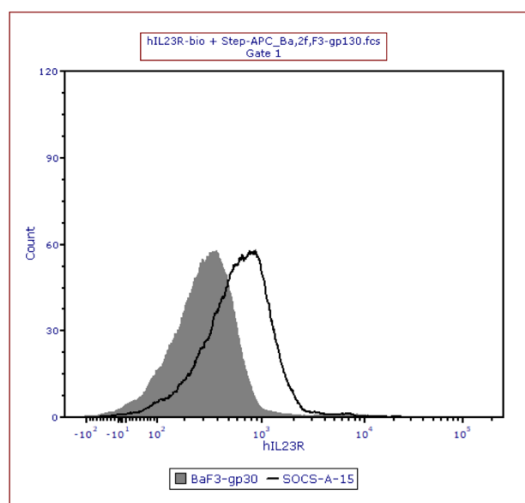


Ergänzende Abb. 6: Vektorkarte von pMOWS-puro-IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL

6.2 Durchflusszytometrie

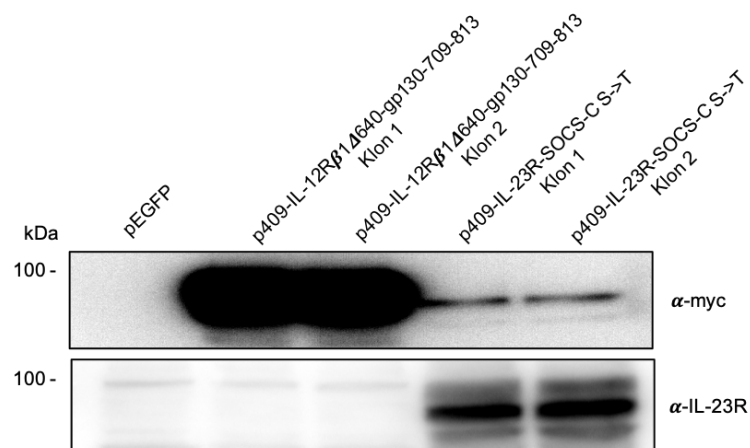


Ergänzende Abb. 7: Durchflusszytometrie der Zelllinie Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-gp130 und Detektion des IL-23R durch Zugabe von α -IL-23R, erhoben von Doreen M. Floss.

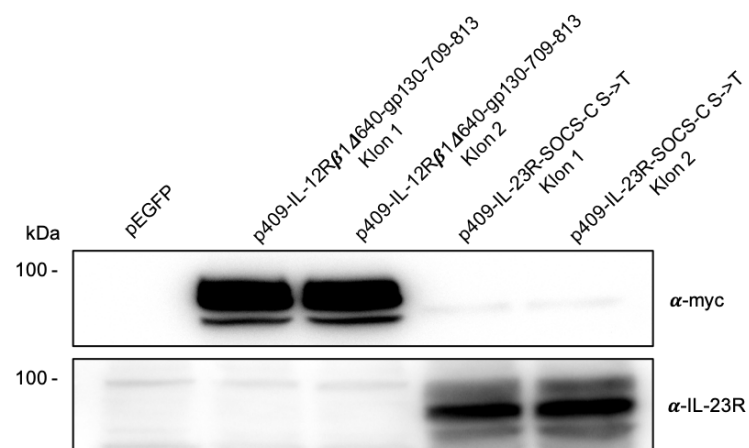


Ergänzende Abb. 8: Durchflusszytometrie der Zelllinie Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-SOCS-A und Detektion des IL-23R durch Zugabe von α -IL-23R, erhoben von Doreen M. Floss.

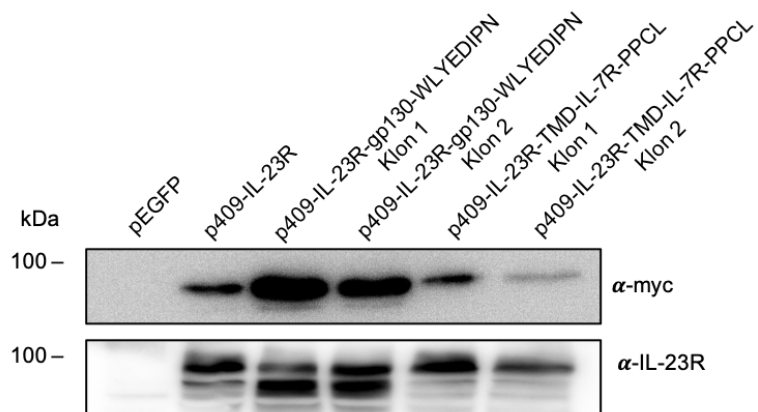
6.3 Western Blot



Ergänzende Abb. 9: Vollständige Darstellung des Western Blot der Rezeptorvarianten IL-12Rβ1Δ640-gp130-709-813 sowie IL-23R-SOCS-C S->T und der Negativkontrolle pEGFP und Detektion von α-myc bzw. α-IL-23R.



Ergänzende Abb. 10: Vollständige Darstellung des Western Blot der Rezeptorvarianten IL-12Rβ1Δ640-gp130-709-813 sowie IL-23R-SOCS-C S->T und der Negativkontrolle pEGFP und Detektion von α-myc bzw. α-IL-23R.



Ergänzende Abb. 11: Vollständige Darstellung des Western Blot der Rezeptorvarianten IL-23R-gp130-WLYEDIN sowie IL-23R-TMD-IL-7R-PPCL, der Negativkontrolle pEGFP und Positivkontrolle IL-23R und Detektion von α -myc bzw. α -IL-23R.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei meiner Doktormutter PD Dr. Doreen M. Floss bedanken. Ohne ihre Hilfe, Unterstützung und unermüdlichen Tatendrang hätte ich dieses Projekt niemals so verwirklichen und umsetzen können. Ihr immer offenes Ohr für alle kleinen und großen Probleme und mitunter spätabendliche Verfügbarkeit für dringende Fragen haben mir durch so manche schwierigen Situationen geholfen. Danke!

Ein großer Dank geht auch an Prof. Dr. Jürgen Scheller, der mein Interesse an der Immunologie und Grundlagenforschung geweckt und es mir ermöglicht hat, dieses Projekt durchzuführen. Vielen Dank für alle Ideen, Anregungen und Korrekturen, ohne die meine Dissertation nicht möglich gewesen wäre!

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeiter*innen im Institut für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken. Ich durfte von jedem etwas lernen, wurde immer unterstützt und habe tolle Freundschaften aus meiner Zeit im Labor mitnehmen dürfen. Mein Dank geht insbesondere an Yvonne Arlt, die mir viel beigebracht und geholfen hat.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Meryem Ouzin bedanken, die mir gerade in meiner ersten Zeit im Labor und auch jetzt immer zur Seite steht, mir noch so grundlegende Fragen beantwortet und fast nie an mir verzweifelt. Ich danke ihr für die Freundschaft, die aus unsere gemeinsamen Laborzeit entstanden ist und für ihre Hilfe an diesem Projekt. Auch Max Busch gebührt an dieser Stelle mein Dank für seine Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.

Danke an meine Mama, die jede meiner Ideen und Vorhaben immer unterstützt und mir den Rücken stärkt und an meine Schwester Julia, mit der ich die Freude an der medizinischen Forschung teile und mit der ich so manche Ideen austauschen konnte. Danke an alle meine wundervollen Freunde, die mich den ganzen langen Weg begleitet und meine Tief- und Hochpunkte mit mir durchgestanden haben.

Zuletzt möchte ich mich insbesondere bei Philip bedanken, der immer hinter mir steht und mir Liebe, Kraft und Stärke für diese Arbeit und mein Studium gegeben hat. Danke für die Geduld und Unterstützung all die Jahre.